

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А. Н. БАХА

На правах рукописи

Обухов Юрий Николаевич

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ
СЕМЕЙСТВА WSCP-II

Специальность 1.5.4. – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Крицкий Михаил Сергеевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Водорастворимые Хл-связывающие белки	13
1.2. Белки семейства WSCP и их классификация	16
1.2.1. Белки WSCP-I	16
1.2.1.1. Распространение белков WSCP-I в растениях	16
1.2.1.2. Физико-химическая характеристика белков WSCP-I	17
1.2.1.3. Физико-химические различия и филогенетическая отдалённость белков WSCP-I от белков WSCP-II	18
1.2.2. Белки WSCP-II. Разделение на подклассы	19
1.2.2.1. Распространение белков WSCP-II в растениях	20
1.2.2.2. Физико-химическая характеристика белков WSCP-II	21
1.2.2.3. Трёхмерная структура белков WSCP-IIА и IIВ	23
1.2.3. Пигментный состав, фотофизические и фотохимические свойства белков WSCP	28
1.2.3.1. Пигментный состав белков WSCP-I	28
1.2.3.2. Механизмы связывания белками WSCP-II Хл и других пигментов	29
1.2.3.3. Спектральные свойства ПБК WSCP-II	31
1.2.3.4. Пигментный состав Хл-белковых комплексов WSCP-II	32
1.2.3.5. Организация молекул Хл в ПБК WSCP-II	33
1.2.4. Фотохимическая активность белков WSCP	34
1.2.4.1. Фотоконверсия Хл в составе белка WSCP-I	34
1.2.4.2. Фотосенсибилизация химических реакций Хл в белках WSCP и роль АФК	37
1.2.5. Организация Хл в белках WSCP; Конвергентное сходство со «специальной парой» реакционных центров фотосистем	40
1.2.6. О физиологических функциях белков WSCP-I и II	44
1.2.7. Возможное практическое использование белков WSCP	51
1.3. Состояние исследований белков WSCP и тематики данной диссертационной РАБОТЫ	52
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1. Обоснование выбора биологических объектов исследования	54
2.2. Векторы для трансформации клеток <i>ESCHERICHIA COLI</i>	55

2.3. ОБЩИЙ ПЛАН И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОПЕРАЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> , ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БЕЛКИ BoWSCP и LvWSCP	55
2.4. ТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ШТАММОВ <i>E. COLI</i>	56
2.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ КУЛЬТУР ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> XL1-BLUE	57
2.6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	57
2.7. ПРОВЕРКА ПЛАЗМИД НА НАЛИЧИЕ ВСТАВОК НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ BoWSCP и LvWSCP	57
2.8. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРЕПАРАТОВ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА WSCP	58
2.9. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПААГ В ДЕНАТУРИРУЮЩИХ УСЛОВИЯХ ПО МЕТОДУ ЛЭММЛИ	60
2.10. НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПААГ	61
2.11. ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА	61
2.12. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХОЛОБЕЛКОВ WSCP И РАСЧЁТ ИХ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА	62
2.13. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ WSCP ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH ПРЕПАРАТА	63
2.14. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ WSCP В ФЕМТО- И ПИКОСЕКУНДНОМ ДИАПАЗОНЕ ВРЕМЕНИ.....	64
2.15. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ	66
2.16. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ	68
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	69
3.1. ВЫБОР БЕЛКОВ - ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ) ...	69
3.2. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ ХОЛОБЕЛКОВ BoWSCP и LvWSCP С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ НАТИВНОСТИ ИХ СТРУКТУРЫ.....	70
3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ BoWSCP и LvWSCP.....	77
3.3.1. <i>Выявление наиболее ранних свидетельств фотохимической активности холобелков WSCP, проявляющихся спустя фемто- и пикосекунды после возбуждения светом</i>	<i>78</i>
3.3.2. <i>Окислительно-восстановительные реакции с участием АФК и холобелков WSCP</i>	<i>83</i>
3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ХОЛОБЕЛКОВ BoWSCP и LvWSCP К ИЗМЕНЕНИЮ ЗНАЧЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ, pH, А ТАКЖЕ К УЧАСТИЮ В ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ	94
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	99

4.1. Краткое перечисление полученных результатов. Обсуждение связи спектральных свойств белков WSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени с их способностью генерировать АФК.....	99
4.2. Анализ способности холобелков WSCP-II генерировать АФК. Возможная физиологическая роль данных холобелков	101
4.3. Перспективы использования белков WSCP-II в биотехнологии и медицине.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
БЛАГОДАРНОСТИ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BL – «BLeaching in the stimulated emission region», спектр выцветания в области стимулированного излучения
- BobWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Brassica oleracea* var. *botrytis*.
- BogWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Brassica oleracea* var. *gemmifera*.
- BoWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Brassica oleracea*, без указания конкретного подвида растения
- E. coli* – *Escherichia coli*
- ESA – «Excited State Absorption (spectra)», спектр поглощения возбужденного состояния
- FMO – белок Фенна-Мэтью-Олсена
- GSB – «Ground State Bleaching (spectra)», спектр выцветания основного состояния
- IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- LvWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Lepidium virginicum*.
- NADH – никотинамидадениндинуклеотид
- $^1\text{O}_2$ – синглетный кислород
- O_2^{*-} – супероксидный анион-радикал
- PCP – Peridinin-Chlorophyll Protein
- SDS – додецилсульфат натрия
- TA – «Transient Absorption (spectra)», переходные спектры поглощения
- TEMPO – (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил
- WSCP – Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein, Водорастворимый хлорофилл-связывающий белок
- WSCP-I – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок класса I
- WSCP-II – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок класса II без указания подкласса
- WSCP-IIA – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок подкласса IIA
- WSCP-IIВ – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок подкласса IIВ
- а.о. – аминокислотные остатки
- АФК – активные формы кислорода
- п.о. – пары оснований в ДНК
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПБК – пигмент-белковый комплекс
- ФАР – фотосинтетически активная радиация

ФИЦ ХФ РАН – Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н. Н.
Семёнова Российской академии наук

Хл – хлорофилл

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования:

Белки семейства WSCP (Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins) представляют собой водорастворимые растительные белки, которые связывают хлорофилл (Хл), но не локализованы в хлоропластах и не участвуют в процессе фотосинтеза. Водорастворимость Хл-белковых комплексов WSCP отличает данные белки от большинства других Хл-связывающих белков, которые так или иначе ассоциированы с липидной мембраной. Функции белков семейства WSCP в организмах не вполне ясны. Существующие гипотезы связывают активность этих белков с развитием в растительном организме ответа на стресс и функционированием антистрессовых систем [Satoh et al., 2001; Takahashi et al., 2012].

Белки семейства WSCP подразделяют на два филогенетически неродственных и структурно различных класса – класс I и класс II. Белки WSCP класса I (WSCP-I) содержат домен DUF538 и отличаются способностью к фотоконверсии, т.е. изменению под воздействием света химической структуры связанного хромофора и, как следствие, его спектра поглощения. Функциональное значение данных свойств для белков WSCP-I, как и их трехмерная структура, неизвестны [Satoh et al., 2001; Gholizadeh, 2017].

В отличие от белков WSCP-I, представители WSCP класса II (WSCP-II) содержат структурный мотив ингибиторов протеаз Кунитц-типа, а также у них отсутствует явление фотоконверсии [Satoh et al., 2001; Bednarczyk et al., 2016].

Находящиеся в составе Хл-белковых комплексов WSCP-II молекулы Хл организованы в виде двух симметричных димеров внутри гидрофобной зоны белкового матрикса [Bednarczyk et al., 2016]. Такая организация молекул пигмента демонстрирует конвергентное сходство с димерной упаковкой Хл (бактериохлорофилла) в так называемой «специальной паре» реакционных центров фотосистем фототрофных организмов. Именно «специальная пара», т.е. молекулярный димер Хл, служит ключевым звеном первичного фотохимического разделения зарядов – процесса, при котором энергизованная молекула Хл передаёт электрон на молекулу первичного акцептора. Фотохимическая активность «специальной пары» этим не исчерпывается: в условиях светового стресса молекулы Хл в «специальной паре» P680 фотосистемы II могут переходить в триплетно-возбужденное состояние ($^3\text{Хл}$) и генерировать активные формы кислорода (АФК), вызывающие разнообразные редокс-реакции [Neverov, Krasnovsky et al., 2015; Zabelin, Neverov et al., 2016].

При планировании данного диссертационного исследования была поставлена задача ответить на вопрос: способен ли Хл в составе связанных с белком WSCP-II димеров, аналогично Хл «специальной пары» проявлять фотохимическую активность в окислительно-

восстановительных реакциях? До проведения нашей работы чёткий ответ на этот вопрос отсутствовал. При этом в литературе присутствовали противоречивые сведения о свойствах триплетного состояния Хл в холобелках WSCP и генерации синглетного кислорода [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012; Agostini et al., 2017].

Возникает вопрос, проявляют ли Хл-содержащие комплексы белков WSCP-II фотохимическую активность? Ответ на этот вопрос позволил бы пролить свет на функциональные роли данных белков в антистрессовых ответах растений, создать новые модели для исследования проблем фотобиохимической эволюции, а также помочь в конструировании средств фотодинамической терапии.

Цель настоящей работы состояла в анализе способности димеров Хл в холобелках WSCP-II к проявлению фотохимической активности. Работа была сосредоточена в двух направлениях: (1) выявление наиболее ранней фотохимической активности после поглощения Хл в составе WSCP-II кванта света, а также (2) выяснение фотохимической редокс-активности в отношении экзогенных акцепторов и доноров электрона при облучении светом.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **экспериментальные задачи**:

1. Получить методом гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* апобелки WSCP-II, осуществить их самосборку в Хл-белковые комплексы и охарактеризовать полученные холобелки электрофоретическими и спектроскопическими методами.
2. Проанализировать спектроскопические изменения в холобелках WSCP-II в фемто- и пикосекундном диапазонах времени после их возбуждения световым импульсом для выявления свидетельств их фотохимической активности.
3. Исследовать способность холобелков WSCP-II фотосенсибилизировать редокс-реакции с экзогенными донорами и акцепторами электрона. Провести экспериментальный анализ механизмов фотопроцессов.
4. Исследовать устойчивость Хл в холобелках WSCP-II к изменению таких факторов окружающей среды, как световое облучение, температура и изменение значения рН среды.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Теоретическая значимость работы заключается в экспериментальной демонстрации фотохимической активности пигмент-белковых комплексов (ПБК) WSCP-II в виде фотосенсибилизации ими окислительно-восстановительных реакций с участием АФК и других экзогенных молекул. Такая демонстрация вносит вклад в понимание физиологических антистрессовых функций данной группы белков. Практическая значимость работы заключается в создании предпосылок к использованию холобелков WSCP-II для конструирования

фотокатализаторов, биотехнологических препаратов, а также средств для фотодинамической терапии.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Получено свидетельство оттока энергии возбуждения в холобелках BoWSCP на протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между связанным Хл и остатками триптофана в его аминокислотном окружении.
- 2) Выявлена способность холоформ белков семейства WSCP-II к фотоиндуцированному окислению экзогенных доноров электрона – NADH и аскорбата. Показано, что оно реализуется согласно механизму, опосредованному генерацией синглетного кислорода.
- 3) Выявлена способность холоформ белков семейства WSCP-II к фотоиндуцированному восстановлению экзогенного цитохрома *c*. Данное восстановление опосредовано участием супероксидных анион-радикалов.
- 4) Выявлена устойчивость холобелков WSCP-II к таким факторам среды, как световое облучение, температурное воздействие и изменение значения pH среды.

Степень разработанности темы исследования:

К началу выполнения данной работы отсутствовали свидетельства о проявлении холобелками WSCP-II фотохимических свойств в фемто- и пикосекундном диапазонах времени после возбуждения светом. Также отсутствовали данные о фотохимическом взаимодействии холобелков WSCP-II с экзогенными донорами и акцепторами электрона и о механизмах данного взаимодействия. Целенаправленное исследование устойчивости холобелков WSCP-II к изменениям факторов среды также ранее не проводилось.

Научная новизна:

В настоящей работе в фемтосекундном временном интервале после возбуждения светом холобелков BoWSCP показан отток энергии возбуждения в них на протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между связанным Хл и остатками триптофана в его аминокислотном окружении. Впервые экспериментально продемонстрировано наличие у холобелков WSCP-II фотохимической активности, проявляющейся в индукции димерами Хл в составе холобелков WSCP фотопроцессов окисления доноров (NADH и аскорбата) и восстановления акцептора электрона (цитохром *c*). Изучение механизмов этих фотохимических реакций в данной работе показало, что фотоиндуцированное холобелками WSCP окисление NADH и аскорбата происходит через генерацию Хл синглетного кислорода, а восстановление цитохрома *c* – через

образование супероксидного анион-радикала. Показана устойчивость структуры холобелка и хромофорной группы WSCP-II к процессам сенсibilизации ими фотохимических реакций, к действию светового излучения, а также к изменениям температуры и pH среды.

Степень достоверности и апробация результатов:

Достоверность полученных в работе результатов определяется следующими факторами:

- Качество и нативность получаемых в ходе работы препаратов апобелков и холобелков контролировали путём проверки структуры экспрессионного вектора (рестрикционный анализ ДНК плазмид и секвенирование целевых генов WSCP для подтверждения отсутствия делеций и мутаций), путём проверки качества очистки получаемых препаратов (методами денатурирующего и нативного электрофореза в ПААГ), а также проверки совпадения спектральных свойств препаратов с опубликованными в литературе данными (абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма (КД)).

- Фотохимические эксперименты выполняли не менее чем в трёх независимых повторностях, результаты обрабатывали с использованием стандартных приёмов математической статистики. Исследование холобелков WSCP-II методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» проводили на уникальном оборудовании ФИЦ химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН (ФИЦ ХФ РАН).

Публикации результатов исследования:

По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Также результаты представлены в виде материалов 11 профильных научных конференций.

Личный вклад автора:

Личный вклад автора заключается в выполнении всего объема экспериментальной работы. Исследование холобелков WSCP-II методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» проводили на оборудовании ФИЦ ХФ РАН совместно с Д.А. Черепановым, А.В. Айбушем, Г.Е. Милановским и В.А. Надточенко. Автором выполнен также весь объём работ по оформлению результатов и заключений, а также написанию текста диссертации и автореферата.

Методология и методы исследования:

Гены целевых белков WSCP присутствовали в векторах для бактериальной экспрессии pet24b+, и их белковые продукты содержали на конце последовательности полигистидиновый участок. Векторы были получены от зарубежных коллег (Prof. Dr. Hiroyuki Satoh, Toho University,

Япония, а также Dr. Mara Werwie и Prof. Dr. Harald Paulsen, Johannes Gutenberg University, Mainz, Германия). Белки WSCP, использованные в работе, экспрессировали в клетках штамма *Escherichia coli* BL21(DE3).

Экспрессию белков WSCP в клетках *Escherichia coli* индуцировали с помощью изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG), затем клетки лизировали ультразвуком, а целевые апобелки выделяли из лизата методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе. Для получения препаратов холобелков использовали оптимизированную методику, при которой лизат клеток инкубировали в течение часа с предварительно свежеприготовленным из листьев шпината осадком тилакоидов и затем предварительно очищали от посторонних белков 10-минутным прогреванием до 100 °С. Денатурированные белки осаждали центрифугированием, а супернатант очищали методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе.

Чистоту и нативность полученных препаратов холобелков WSCP оценивали с помощью методов нативного электрофореза в ПААГ и денатурирующего электрофореза в ПААГ по Лэммли, методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также спектроскопии КД.

Изучение процессов, происходящих в холобелках BoWSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени после облучения светом, осуществляли на уникальном оборудовании ФИЦ ХФ РАН – установке для широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» совместно с вышеперечисленными сотрудниками данного центра.

Для проведения экспериментов по исследованию редокс-реакций, индуцируемых возбужденным Хл в составе холобелков WSCP, экспериментальную смесь в кварцевой кювете облучали красным светом ($\lambda \geq 650$ нм), который поглощался только Хл в составе холобелка WSCP. Интенсивность облучения варьировали с помощью нейтральных светофильтров в диапазоне от 250 до 1800 $\mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Изменение концентрации экзогенных участников редокс-реакций регистрировали по их спектрам поглощения с использованием коэффициентов молярной экстинкции, взятых из литературы.

Температуру препаратов холобелков WSCP в ходе измерений их спектров поглощения изменяли с помощью пропускания воды с заданной температурой через водяную рубашку кюветодержателя спектрофотометра. Значения pH растворов препаратов холобелков WSCP контролировали с помощью pH-метра и изменяли непосредственно перед измерением их спектров поглощения путём добавления растворов щелочей или кислот к препарату.

Финансовая поддержка:

Выполнение работы частично финансировалось грантом РНФ №21-74-20155 (2021 – 2024 гг.). Грант был посвящен «проведению исследований на базе существующей научной

инфраструктуры мирового уровня» с использованием уникального оборудования ЦКП ФИЦ ХФ РАН. Руководитель гранта – М.С. Крицкий.

Структура и объем работы:

Научно-квалификационная работа включает 126 страниц машинописного текста, 1 таблицу, 36 рисунков и содержит разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Благодарности». Список цитированной литературы включает 161 источник.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Водорастворимые Хл-связывающие белки

Из всего разнообразия Хл-содержащих ПБК фотосинтетических организмов практически все представители локализованы в липидной мембране, а растворимость в воде для данной группы белков является скорее исключением, чем правилом. В настоящее время известно лишь ограниченное количество водорастворимых белков, способных связывать Хл или бактериохлорофилл.

К таким белкам относится, например, белок Fenna–Mathews–Olson (FMO), участвующий в неокисленном фотосинтезе. Белок назван в честь его первооткрывателя Джона Олсена (John Olson) и первых исследователей, установивших его структуру – Роджера Фенна (Roger Fenna) и Брайана Мэтьюса (Brian Mathews) [Olson, Romano, 1962; Fenna et al., 1975]. В цитоплазматической мембране клеток зелёно-серных бактерий и ацидобактерий данный белок соединяет антенны хлоросом с реакционным центром и опосредует передачу световой энергии от светособирающих антенных комплексов к реакционному центру фотосистемы, погруженному в цитоплазматическую мембрану [Saer et al., 2017]. Предполагается, что эволюционным предшественником этого белка был белок PscA, который входит в состав реакционного центра зеленых сульфобактерий [Olson, 2005].

Белок FMO является гомотримером (рисунок 1). Масса нативного гомотримера FMO составляет около 140,5 кДа, а масса денатурированного белка – около 40 кДа [Wen et al., 2011]. Его мономер содержит 365-366 а.о., в своём составе он имеет 15 β-цепей и шесть коротких α-спиралей [Olson, 2005]. Каждый мономер белка содержит по 7 молекул бактериохлорофилла *a*, свободно обменивающихся энергией возбуждения друг с другом и упакованных внутри белкового домена типа «открытый β-сэндвич». Среди них молекула бактериохлорофилла *a*, обозначаемая как «№3», обладает наименьшей энергией и располагается в непосредственной близости к реакционному центру. На другом конце гомотримера, в пространстве между субъединицами (вне белкового домена) располагаются ещё три молекулы бактериохлорофилла (восьмая молекула в расчёте на мономер), которые являются приёмниками энергии из основания хлоросом [Saer et al., 2017].

Другим известным водорастворимым белком, связывающим Хл, является белок PCP (Peridinin-Chlorophyll Protein) из динофлагеллят. Данный белок играет роль периферической светособирающей антенны и является (в зависимости от видовой принадлежности организма) либо димером из двух отдельных 15 кДа субъединиц (рисунок 2), либо единой, «слитой» в ходе эволюции, белковой молекулой с массой 32 кДа [Hofmann et al., 1996; Schulte et al., 2010]. Каждая субъединица белка в своей укладке состоит из восьми α-спиралей и содержит одну молекулу Хл

а, окруженную обычно четырьмя молекулами перидинина [Prezelin et al., 1976; Hofmann et al., 1996; Schulte et al., 2009; Agostini, Niklas et al., 2018].

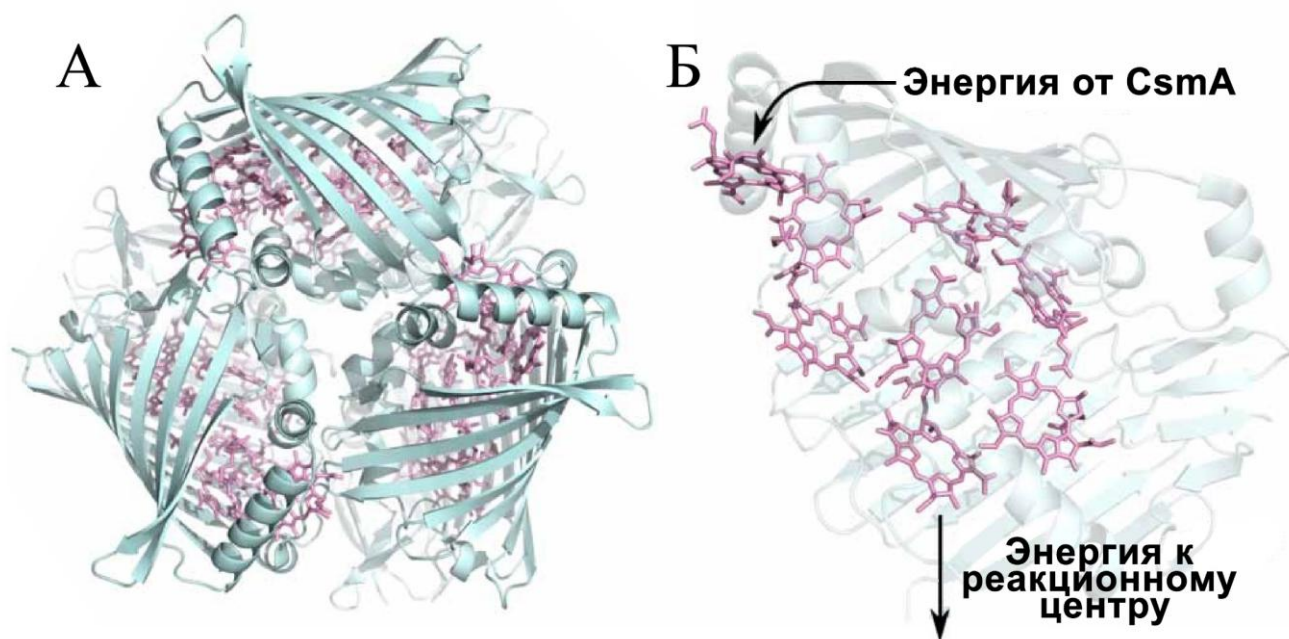


Рисунок 1. Структура белка FMO из *Chlorobaculum tepidum*. (А) – Гомотримерный комплекс FMO из *C. tepidum* (PDB ID: 3ENI). (Б) – Мономер FMO с молекулами бактериохлорофилла (фитольные хвосты пигментов не показаны). Стрелками показаны молекулы бактериохлорофилла «№8» (вверху) и «№3» (внизу), непосредственно участвующие в приёме энергии на комплекс FMO и передаче её на реакционный центр [Saer et al., 2017].

Таким образом, структура входящих в семейства РСР и FMO белков изучена ещё в прошлом столетии, причём достоверно установлено, что они участвуют в процессах фотосинтеза в качестве компонентов антенных комплексов [Prezelin et al., 1976; Song et al., 1976; Saer et al., 2017]. Благодаря своей хорошо изученной и относительно простой структуре белки этих семейств активно используют в качестве объектов исследования для анализа пигмент-пигментных и пигмент-белковых взаимодействий [Hofmann et al., 1996; Tronrud et al., 2009; Schulte et al., 2010; Wen et al., 2011; Jiang et al., 2012; Carbonera et al., 2014].

Вышеописанные белки обладают механизмами рассеивания невостробованной энергии возбуждения у молекул Хл/бактериохлорофилла, что предотвращает генерацию ими синглетного кислорода (далее – $^1\text{O}_2$). Так, связанная с белком РСР молекула перидинина Рer-614, находящаяся среди других пигментов в наиболее близком контакте с молекулой Хл, не только служит основным переносчиком энергии возбуждения на данную молекулу Хл, но также является эффективным тушителем триплетного возбужденного состояния данного пигмента. Таким образом присутствие молекулы Рer-614 не только помогает белку выполнять функции

светособирающей антенны, но также и предотвращает генерацию им АФК [Schulte et al., 2009; Agostini, Niklas et al., 2018].

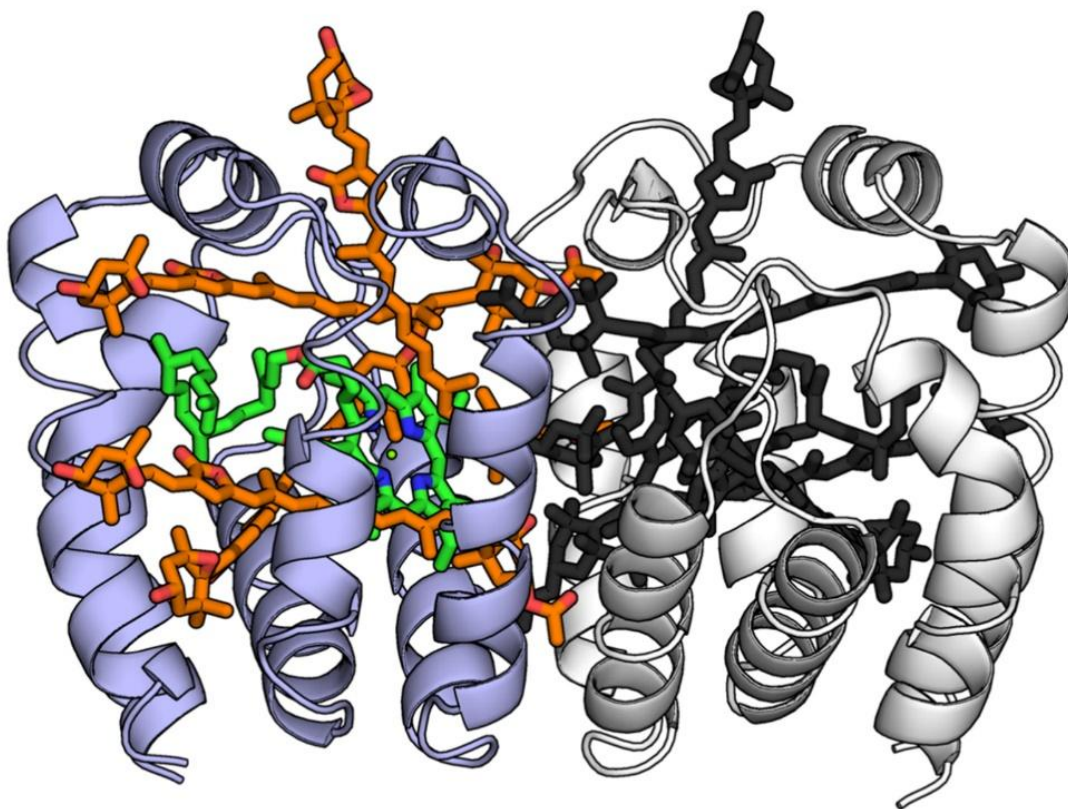


Рисунок 2. Структура комплекса РСР из *Amphidinium carterae*. Две идентичные субъединицы выделены фиолетовым и чёрным цветами [Agostini, Niklas et al., 2018].

Белок FMO обладает особыми защитными механизмами, не требующими присутствия молекул каротиноидов. Суть первого механизма состоит в том, что молекулярное окружение пигментов в данном белке обеспечивает снижение энергии их триплетного состояния ниже порога, необходимого для генерации $^1\text{O}_2$ [Hartzler et al., 2014; Kihara et al., 2015]. Согласно второму механизму, два остатка цистеина данного белка (49-й или 353-й) в аэрированном растворе могут превратиться в тиильный радикал, который может тушить возбуждение ближайших молекул бактериохлорофилла [Saer et al., 2017].

Существует, наконец, ещё одна группа водорастворимых белков, способных связывать Хл или бактериохлорофилл. В организмах некоторых высших растений обнаружены белки семейства WSCP (Water-Soluble Chlorophyll-binding Proteins, т.е. буквально «Водорастворимые Хл-связывающие Белки») [Bednarczyk et al., 2015; Agostini et al., 2017]. Именно эти белки стали объектами исследования в данной диссертационной работе.

Данная группа занимает особое место среди водорастворимых Хл-связывающих белков. Внутриклеточная локализация белков WSCP вне хлоропластов позволяет заключить, что они, в отличие от белков FMO и РСР, не участвуют в процессе фотосинтеза [Takahashi et al., 2012;

Takahashi, Yanai et al., 2013; Agostini et al., 2017]. Функции этих белков в растениях не вполне ясны. Хл в их составе проявляет более высокую фотостабильность, чем несвязанные молекулы Хл, причём в данных белках, в отличие от белков FMO и PCP, не обнаружены каротиноиды или какие-либо иные механизмы, предотвращающие генерацию $^1\text{O}_2$ [Agostini et al., 2017].

1.2. Белки семейства WSCP и их классификация

Первые представители семейства белков WSCP были открыты в шестидесятых-семидесятых годах прошлого столетия, т.е. практически в одно время с белком FMO [Yakushiji et al., 1963; Murata, Murata, 1971; Murata, Toda et al., 1971]. Однако, в отличие от белков FMO и PCP, информация о структуре белков данной группы долгое время не была опубликована в литературе.

К 2001 году накопилось достаточно данных, чтобы подразделить семейство белков WSCP на два класса: WSCP-I и WSCP-II [Kamimura et al., 1997; Satoh et al., 2001]. В качестве главного критерия разделения семейства на данные классы была принята способность/неспособность их представителей к фотоконверсии, т.е. к изменению под воздействием света структуры молекулы пигмента и, как следствие, спектра поглощения холобелка. Свойством фотоконверсии обладают белки WSCP-I, но не белки WSCP-II [Satoh et al., 2001]. В 2014 году анализ аминокислотных последовательностей белков обоих классов (I и II) выявил, что они по структуре относятся к разным группам белков – семейству DUF538 и семейству ингибиторов протеиназ Кунитц-типа соответственно.

Можно сделать вывод, что семейство белков WSCP подразделяется на два неродственных и не имеющих между собой структурного сходства класса: I (DUF538) и II (Kunitz-type) [Satoh et al., 2001; Takahashi, Yoshikawa et al., 2013; Gholizadeh, 2017]. В единое семейство WSCP они сведены лишь в силу исторической традиции и по совокупности таких общих признаков, как способность связывать Хл, водорастворимость ПБК, а также их присутствие исключительно в растительных клетках [Kamimura et al., 1997; Satoh et al., 2001].

1.2.1. Белки WSCP-I

1.2.1.1. Распространение белков WSCP-I в растениях

Впервые белок WSCP-I был обнаружен Yakushiji и соавт. (1963) в растении «марь белая» (*Chenopodium album*). На сегодняшний день белки данного класса обнаружены в растениях родов амарант (*Amaranthus*), лебеда (*Atriplex*), марь (*Chenopodium*) и гречишник (*Polygonum*) [Takamiya, 1973; Satoh et al., 2001]. Первые три рода относятся к семейству амарантовые (*Amaranthaceae*), последний род – к семейству гречишные (*Polygonaceae*); оба входят в порядок гвоздичноцветные (*Caryophyllales*) [The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016]. Итого можно сделать вывод, что

белки WSCP-I обнаружены в растениях таксономически близких групп [Satoh et al., 2001]. При этом не удалось выявить корреляции между присутствием данного белка в организме и проявлением у этого же организма С3 или С4 типа фотосинтеза [Takamiya, 1973; Satoh et al., 2001].

Исторически открытый раньше остальных белок WSCP из мари белой (*Chenopodium album*), который далее фигурирует в тексте как CaWSCP [Yakushiji et al., 1963], на данный момент является наиболее изученным представителем белков WSCP-I. На сегодня лишь для него [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013] и ещё для двух белков WSCP из мари фиголистной (*Chenopodium ficifolium*) [Takahashi, Abe et al., 2015] известна последовательность аминокислот и нуклеотидная последовательность гена. Белки WSCP-I из других видов растений в структурном плане изучены ещё меньше.

Исследование органной локализации белка CaWSCP в растениях мари белой выявило, что он присутствует, в основном, в стебле и, в меньшей степени, в листьях, при этом количество данного белка в соответствующих частях растения снижается по мере старения [Goedheer et al., 1977; Satoh et al., 2001].

1.2.1.2. Физико-химическая характеристика белков WSCP-I

Представления о структуре белков этого класса базируются в основном на результатах исследования белка CaWSCP. При первоначальной оценке молекулярная масса холоформы CaWSCP была определена в 78 кДа [Takamiya, 1973; Satoh et al., 2001], однако при последующей оценке выяснилось, что она составляет 69 кДа [Oku, Tomita, 1975], а молекулярная масса апобелка CaWSCP определена равной 15,9 кДа [Hirabayashi et al., 2006]. Холоформа белка CaWSCP, предположительно, является тетрамером [Takahashi, Seki et al., 2014; Takahashi, Seki et al., 2015].

Выделенная кДНК гена белка CaWSCP имеет открытую рамку считывания в 585 п.о., кодирующую 195 а.о. и не включающую в себя интроны. Закодированный в гене белок имеет расчетную массу 18,4 кДа [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013], что, при сравнении с измеренной массой апобелка в 15,9 кДа [Hirabayashi et al., 2006], может указывать на отсутствие в зрелом белке 23 С-терминальных аминокислотных остатков, присутствовавших в полипептидном продукте трансляции [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013]. На основании нуклеотидной последовательности гена белок CaWSCP был классифицирован как белок семейства DUF538. Белки данного семейства найдены в 39 видах растений, которые относятся к таксономической группе высших растений (*Embryophyta*) [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013].

Структура ПБК CaWSCP на данный момент остаётся неизвестной. Несмотря на то, что первые кристаллы данного белка с целью последующего их рентгеноструктурного анализа были

впервые получены ещё в 2007 году [Ohtsuki et al., 2007], его трехмерная структура до сих пор не опубликована.

1.2.1.3. Физико-химические различия и филогенетическая отдалённость белков

WSCP-I от белков WSCP-II

В настоящее время сравнить трехмерную структуру ПБК WSCP классов I и II невозможно, так как для белков класса I не опубликованы соответствующие данные. Однако степень структурного различия белков данных групп между собой можно предугадать путём сравнения уже изученных структурных параметров: молекулярной массы апобелков, их аминокислотной последовательности и смоделированных *in silico* мотивов укладки.

Апобелки WSCP-I и WSCP-II имеют различающиеся на 16-20% молекулярные массы: 16 кДа [Hirabayashi et al., 2006] и 19-20 кДа [Takahashi et al., 2012; Horigome et al., 2007] соответственно.

Первичная структура белков WSCP-I характеризуется наличием домена с неизвестной функцией DUF538 и не содержит в себе аминокислотных мотивов, сходных с ингибиторами протеиназ Кунитц-типа [Gholizadeh, 2017]. Белки WSCP-II, наоборот, имеют домен ингибиторов протеиназ Кунитц-типа, но домен DUF538 в них не описан [Horigome et al., 2007]. Филогенетически носители данных доменов неродственны и не обнаруживают значимого сходства в аминокислотной последовательности [Gholizadeh, 2017].

Компьютерное моделирование структуры белков WSCP-I, проведённое на основе известной аминокислотной последовательности [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013], предсказывает присутствие в них многочисленных β -складчатых структур, уложенных в отдельные антипараллельные β -складки, расположение которых не похоже на структуру белков WSCP-II (рисунок 3) [Gholizadeh, 2015; Gholizadeh, 2016]. Белки WSCP-II хоть и состоят (аналогично белкам WSCP-I) из β -складчатых структур, но проявляют более сложную укладку β -трилистника из двенадцати β -слоев, типичную для ингибиторов сериновых протеаз Кунитц-типа [Horigome et al., 2007; Bednarczyk et al., 2016].

Совокупность вышеизложенных фактов прямо указывает на отсутствие филогенетического и значимого структурного сходства между апобелками WSCP-I и WSCP-II. По данной причине невозможно экстраполировать какие-либо известные свойства белков WSCP-I на белки WSCP-II, и в особенности – экстраполировать способность к сенсibilизации тех или иных фотохимических реакций.

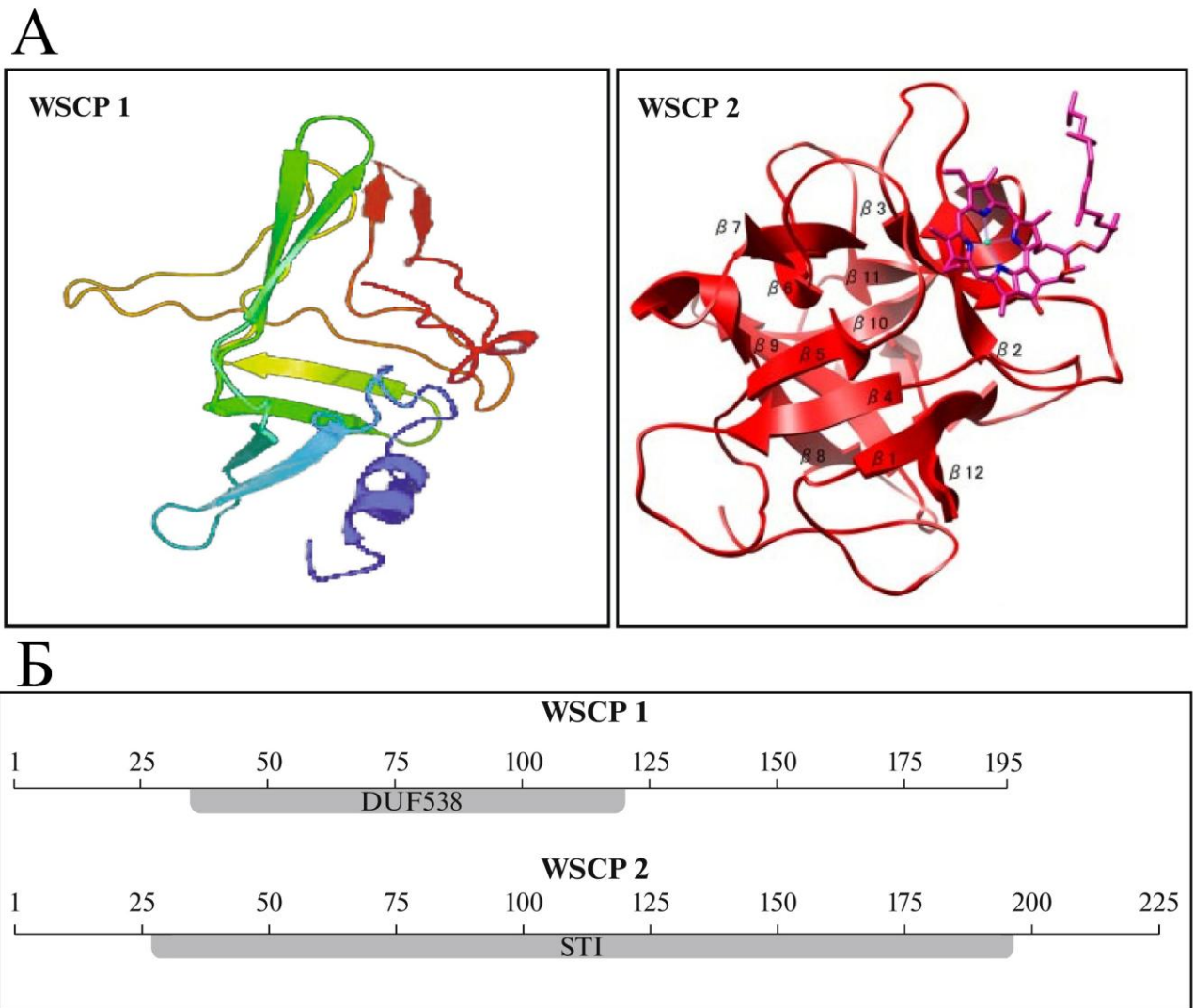


Рисунок 3. (А) – Результат моделирования третичной структуры апобелка WSCP-I (слева) [Gholizadeh, 2017] и структура субъединицы тетрамерного холобелка WSCP-II (справа) из *Lepidium virginicum* (PDB ID: 2DRE) с молекулой Хл [Horigome et al., 2007]. (Б) – Предсказанная доменная структура белков WSCP-I и WSCP-II с отмеченным расположением домена DUF538 и домена ингибиторов протеиназ Кунитц-типа [Gholizadeh, 2017].

1.2.2. Белки WSCP-II. Разделение на подклассы

Помимо вышеописанного разделения белков WSCP на два неродственных класса I и II [Kamimura et al., 1997; Satoh et al., 2001], белки WSCP-II по ряду других признаков подразделяют на два подкласса: «IIA» и «IIB». Разделение изначально основано на разном пигментном составе комплексов: белки подкласса IIA более активно связывают Хл *a*, чем Хл *b* (соотношение Хл *a* / Хл *b* в холоформе = 6,3 - 10), в то время как белки подкласса IIB связывают оба типа Хл в соотношении, близком к эквимолярному (соотношение Хл *a* / Хл *b* в холоформе = 1,5-3,5) [Satoh et al., 1998; Satoh et al., 2001]. В дальнейшем к признакам разделения на подклассы добавилось различное положение на спектрах поглощения полосы Q_y -перехода: у белков WSCP подкласса

IIA она располагается приблизительно при 673 нм, а у белков WSCP подкласса IIB – приблизительно при 663 нм [Prabahar et al., 2020]. В отдельный, третий, подкласс белков – II'X' – были выделены белки WSCP, утратившие в ходе эволюции способность связывать Хл [Prabahar et al., 2020].

1.2.2.1. Распространение белков WSCP-II в растениях

Впервые белок WSCP-IIA был выделен из цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) в 1971 году, а клонирование его гена было осуществлено в 1998 году [Murata, Toda et al., 1971; Satoh et al., 1998]. В настоящий момент белки WSCP-IIA обнаружены в цветной капусте (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), черной горчице (*Brassica nigra*), рапсе (*Brassica napus*), брюссельской капусте (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), японской редьке (*Raphanus sativus* var. *hortensis*), листовой капусте (*Brassica oleracea* var. *acephala*), японской дикой редьке (*Raphanus sativus* var. *raphanistroides*) и резуховидке Таля (*Arabidopsis thaliana*) [Shinashi et al., 2000; Takahashi, Ono et al., 2013; Takahashi, Yanai et al., 2013]. Исторически сложилось, что для белков из вышеописанных растений часто используют собственные наименования, построенные из начальных букв родового и видового названия. Так, например, белок из *Brassica oleracea* var. *gemmifera* называют BoWSCP [Nishio et al., 1997], белок из *Arabidopsis thaliana* – AtWSCP, а белки из *Raphanus sativus* – RsWSCP [Satoh et al., 2002].

Использование такого рода сокращений весьма удобно, однако, с учётом таксономической однородности списка исследуемых растений, оно часто вызывает путаницу, особенно в случаях, когда конкретно требуется указать подвид. Например, белки WSCP из брюссельской капусты (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) и цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), несмотря на принадлежность к одному виду и отличие первичной структуры лишь на два аминокислотных остатка [Takahashi et al., 2012], имеют разное соотношение связанного в составе холобелков Хл *a* / Хл *b*. Чтобы разделять данные виды белков, в некоторых публикациях [Bednarczyk et al., 2015; Bednarczyk et al., 2016; Prabahar et al., 2020; Bednarczyk et al., 2021; Lahav et al., 2021] белок WSCP из цветной капусты (*B. oleracea* var. *botrytis*) обозначают наименованием CaWSCP (сокращение от Cauliflower WSCP) вместо BoWSCP. Однако данное новое название нельзя корректно использовать, так как сокращение CaWSCP уже давно используют для белка WSCP-I из мари белой (*Chenopodium album*) [Takahashi S., Yoshikawa et al., 2013; Takahashi, Uchida et al., 2014A; Takahashi, Abe et al., 2015]. Решением проблемы могло бы стать использование в сокращенном названии белков не только первых букв латинских названий семейства и вида, но и ещё первых букв названий подвида. Например, белки WSCP из брюссельской капусты (*B. oleracea* var. *gemmifera*) можно было бы именовать как BogWSCP, а белки из цветной капусты (*B. oleracea* var.

botrytis) можно было бы именовать как BobWSCP или как уникальное сокращение от Cauliflower WSCP – CauWSCP.

Также стоит упомянуть существование и таких белков – представителей группы WSCP-II, которые в момент их открытия не были причислены к данной группе и поэтому имеют свои специфические названия (как, например, BnD22) [Downing et al., 1992; Reviron et al., 1992; Annamalai et al., 1999].

Первый и, к настоящему времени, наиболее исследованный белок – представитель группы WSCP-IIВ был выделен из клоповника виргинского (*Lepidium virginicum*; LvWSCP) в 1971 году [Murata, Murata, 1971]. Помимо него, белки WSCP-IIВ найдены в пекинской капусте (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*, PksWSCP) и резухе альпийской (*Arabis alpina*, AlpWSCP) [Prabahar et al., 2020].

Помимо рассмотренных представителей подгрупп WSCP-II существуют также белки, проявляющие структурное сходство с белками WSCP-II, но явно утратившие способность связывать Хл. Такие белки, полученные из пекинской капусты (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*, два вида PkaWSCP и PkpWSCP) и дикой капусты (*Brassica oleracea* var. *Oleracea*, Ol3WSCP), в 2020 году были выделены в отдельный класс WSCP II'X' [Prabahar et al., 2020], но в дальнейшем новой информации об их исследовании не было опубликовано.

1.2.2.2. Физико-химическая характеристика белков WSCP-II

Хл-белковые комплексы BoWSCP представляют собой относительно крупные молекулы и имеют коэффициент седиментации 4,6 Св (S), а Хл-белковые комплексы LvWSCP – 5,1 Св (S) [Bednarczyk et al., 2021].

Согласно данным MALDI-ToF масс-спектрометрии, молекулярная масса мономера LvWSCP, состоящего из 180 а.о., составляет 19611 Да [Horigome et al., 2007; Takahashi, Yanai et al., 2013]. При её сравнении со структурой белка, рассчитанной на основании последовательности кДНК, можно прийти к выводу, что в зрелом LvWSCP отсутствует 26 N-терминальных и 17 C-терминальных а.о. [Horigome et al., 2007; Takahashi, Yanai et al., 2013].

Измеренная также с использованием масс-спектрометрии молекулярная масса мономера BogWSCP (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), состоящего из 178 остатков, составляет 19008 Да [Takahashi et al., 2012]. При её сравнении со структурой, рассчитанной на основании последовательности кДНК, становится ясно, что в зрелом BoWSCP отсутствует 19 N-терминальных и 21 C-терминальных а.о. [Takahashi et al., 2012]. Аналогичную длину – 178 а.о. – имеет зрелый белок WSCP из черной горчицы (*Brassica nigra*) [Ono et al., 2016].

Белок WSCP из рапса (*Brassica napus*) со специфическим названием BnD22 состоит из 177 ± 1 аминокислоты, и его фактическая молекулярная составляет 19054 ± 70 Да [Ilami et al., 1997].

Он предварительно подвергается процессингу со стороны С-конца, и удаляемая С-концевая последовательность BnD22 почти строго идентична С-концу белка WSCP из *Raphanus sativus* (кодирующие их нуклеотидные последовательности гомологичны на 80%) [Lopez et al., 1994; Pami et al., 1997].

Гомология аминокислотной последовательности между белками, принадлежащими к классу IIA семейства WSCP, превышает 85% и оценивается как высокая. Что же касается гомологии последовательности между белками подклассов IIA и IIB, то она намного ниже и составляет в среднем 41% [Takahashi et al., 2012]. На основании этого можно предположить, что разделение белков WSCP на подклассы IIA и IIB имеет под собой не только физико-химическую, но и филогенетическую основу.

Анализ аминокислотных последовательностей белков WSCP-II на предмет наличия в них участков, которые не связаны с семейством ингибиторов протеиназ Кунитц-типа, но ассоциируются со связывающими Хл белками, выделяет участок 39-PFCPLGI-45. Он гипотетически может играть роль в связывании Хл, так как имеет гомологию с мотивом (F/Y)DPLGL «светособирающего Хл *a/b*-связывающего белка» и мотивом PFDPLGL родственного ему белка CP29 ячменя [Satoh et al., 1998; Satoh et al., 2001].

Во всех белках WSCP-II N-концевой пептид является сигнальным для транспортирования белков в эндоплазматический ретикулум [Satoh et al., 1998]. С-концевой пептид белков WSCP-II содержит в себе семь высококонсервативных аминокислот L[K/R]MFPHY [Satoh et al., 2001] и, аналогично N-концевому пептиду, подвержен процессингу, однако его функциональная роль на данный момент неясна. В опытах с рекомбинантными белками показано, что присутствие С-концевого пептида значительно снижало растворимость и стабильность комплексов WSCP по сравнению с белками, лишенными этого пептида. В частности, белок BnD22 с С-концевым пептидом имел склонность к агрегации во время очистки, а белки LvWSCP и RsWSCP с С-концевыми пептидами проявляли меньшую термостабильность [Takahashi, Uchida et al., 2014B; Bouargalne et al., 2023].

Важной особенностью холобелков WSCP-II является их термостабильность. Комплексы белков WSCP-II с Хл очень термостабильны и не распадаются даже при кипячении [Kamimura et al., 1997, Schmidt et al., 2003; Bektas et al., 2012]. При этом комплексы с хлорофиллидами (предшественниками Хл, не содержащими фитольной цепочки) распадаются при нагревании [Bektas et al., 2012]. С помощью сайт-специфического мутагенеза было показано, что искажения в конформации фитольных цепей не влияют на термостабильность комплекса [Palm et al., 2019].

К специфическим характеристикам белковых молекул данного класса можно отнести значения их изоэлектрической точки (pI), которые у белков WSCP-II следующие: RsWSCP – 7,5;

BnD22 – 5,1; BogWSCP – 4,7; LvWSCP – 4,2-4,5; BobWSCP - 4.6 [Murata, Toda et al., 1971; Murata, Ishikawa, 1981; Kamimura et al., 1997; Lopez et al., 1994].

1.2.2.3. Трехмерная структура белков WSCP-IIA и IIB

Первым белком семейства WSCP, для которого по данным рентгеноструктурного анализа была расшифрована и опубликована трехмерная структура, был белок LvWSCP (подкласс IIB) из клоповника виргинского (*Lepidium virginicum*) [Horigome et al., 2007].

Комплекс этого белка с Хл представляет собой гомотетрамер, включающий четыре белковые цепи из 180 аминокислот (рисунок 4). В центральной части тетрамера расположены четыре молекулы Хл, которые стехиометрически связываются с четырьмя молекулами апобелков WSCP. Конформация каждой молекулы белка имеет типичную укладку β -трилистника из двенадцати β -слоев. Из них цепи 1, 4, 5, 8, 9 и 12 образуют β -бочку, которая покрыта тремя двухцепочечными антипараллельными β -листами, состоящими из оставшихся шести цепей. Подобная укладка белка типична для ингибиторов сериновых протеаз Кунитц-типа [Horigome et al., 2007].

Четыре белковые цепи, которые составляют тетрамер, относительно друг друга находятся почти в строгой кристаллографической группе симметрии 222. Молекулярные поверхности контакта мономеров друг с другом распределены неравномерно ($223 \text{ \AA}^2$ (A / B), $231 \text{ \AA}^2$ (C / D), $174 \text{ \AA}^2$ (A / D), $190 \text{ \AA}^2$ (B / C), $57 \text{ \AA}^2$ (A / C) и $59 \text{ \AA}^2$ (B / D)). Поэтому тетрамер холобелка LvWSCP можно описать как «димер димеров», где пары цепей A = B и C = D являются основными димерами [Horigome et al., 2007].

Данные молекулярного моделирования показали, что пространственное расположение остатков цистеина C45 и C92 в LvWSCP теоретически позволяет им вступить в ковалентное связывание с такими же остатками цистеина соседних субъединиц, что, в свою очередь, теоретически должно повышать термостабильность LvWSCP [Lemke et al., 2019]. Однако экспериментальное подтверждение такого рода ковалентных взаимодействий пока не получено.

В холобелках LvWSCP молекулы Хл хоть и занимают центральное место в составе Хл-белкового комплекса, но вносят лишь второстепенный вклад в фолдинг белка LvWSCP и только соприкасаются с молекулярной поверхностью белковой субъединицы. Это отличает холобелки WSCP от, например, ПБК фотосинтетического аппарата, в которых молекулы Хл интеркалированы в мембранно-связанные белковые спирали и напрямую влияют на их конформацию. Согласно данным компьютерного моделирования, наибольший энергетический вклад в связывание Хл белками LvWSCP вносит координационная связь центрального иона магния молекулы Хл с осевым карбонилем остатка Pro-36 (рисунок 5) [Horigome et al., 2007]. Связь Pro-36 с пигментом образована с син-стороны относительно 17-пропионовой кислоты Хл,

этерифицированной фитильным хвостом. Поскольку большинство других Хл-связывающих белков связывают Хл с анти-стороны (противоположной размещению этой молекулы в холобелках WSCP), было высказано предположение, что именно данная особенность структуры позволяет апобелку WSCP извлекать Хл непосредственно из других ПБК. [Horigome et al., 2007]. Помимо связи между остатком Pro-36 и ионом Mg^{2+} , вклад в поддержание структуры ПБК вносят также водородные связи Хл с аминокислотными остатками Thr-52, Ser-53 и Gln-57 [Lemke et al., 2019].

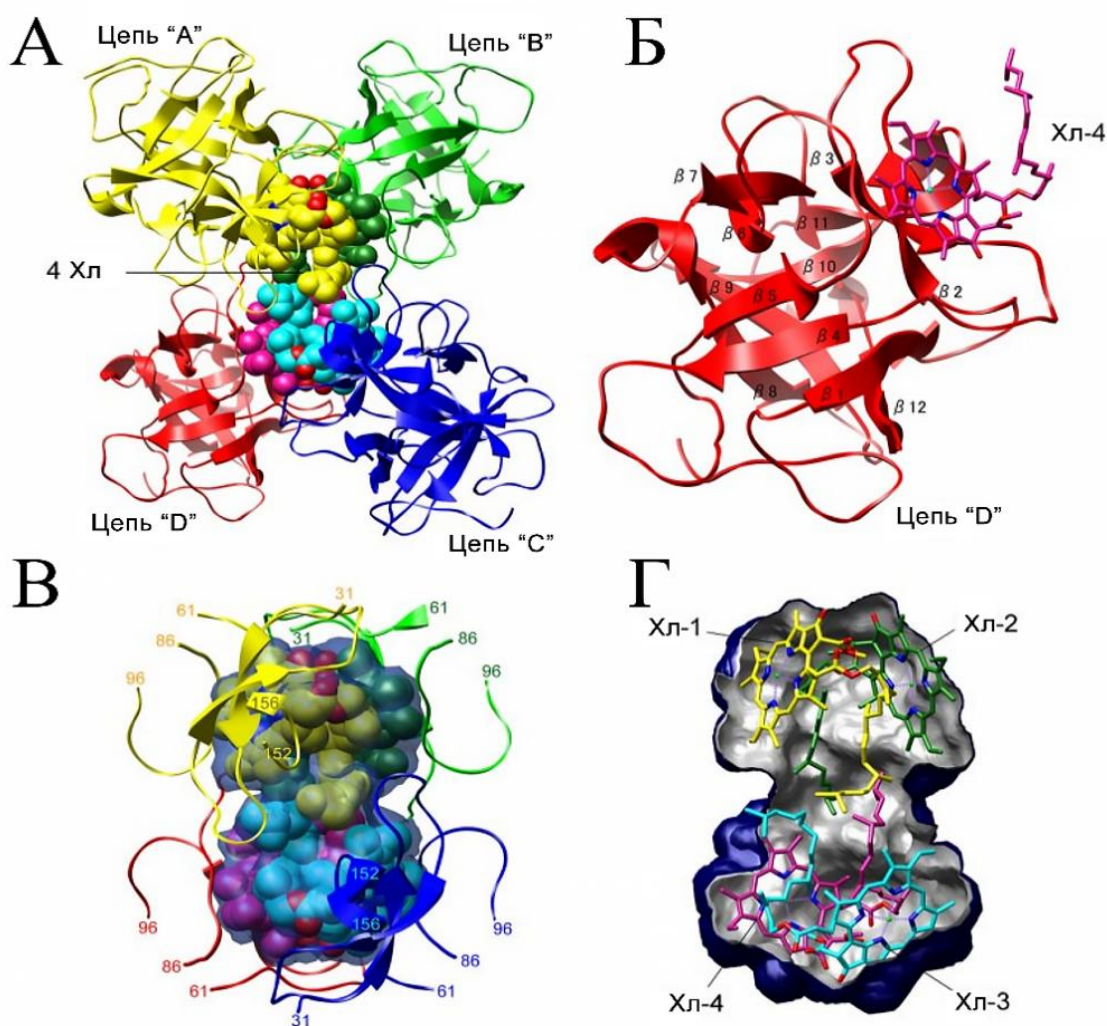


Рисунок 4. Структура холобелков WSCP-II. (А) – Структура тетрамерного Хл-белкового комплекса LvWSCP из *Lepidium virginicum* (PDB ID: 2DRE). (Б) – Подробное изображение цепи “D” из рисунка (А). (В) и (Г) – Подробное изображение гидрофобной полости с включенными в неё молекулами. Наружная поверхность полости окрашена темно-синим, внутренняя – серым цветом [Horigome et al., 2007].

В центре Хл-белкового комплекса WSCP-II образована единая гидрофобная полость, сформированная аминокислотными остатками 31–61, 86–96 и 152–156 каждой полипептидной цепи олигомера. В данной полости молекулы Хл изолированы от основной массы растворителя

и плотно упакованы: внутренний объем в $5300 \text{ \AA}^3$ приблизительно равен объему четырех сгруппированных молекул Хл. При этом в данной полости дополнительно присутствует по одной молекуле воды на молекулу пигмента. Эти молекулы воды связаны водородными связями с кетогруппой в С-13 плоскости Хл и с ϵ -кислородом остатка Gln-57, расположенного в соседней цепи димера [Horigome et al., 2007].

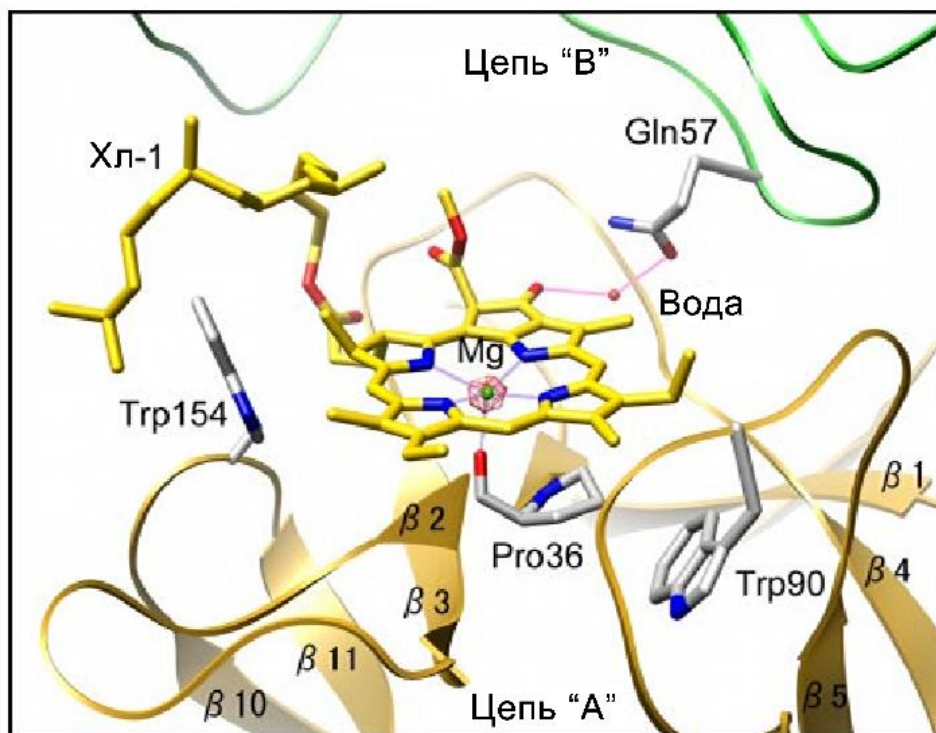


Рисунок 5. Связь между мономером LvWSCP и Хл. Вторая молекула Хл не показана [Horigome et al., 2007].

Важно отметить, что полость внутри белковой глобулы, в которой присутствует Хл, не полностью изолирована от внешней среды и имеет четыре пороподобных отверстия. Данные пороподобные отверстия могут гипотетически служить местом контакта молекул растворителя и молекул Хл, однако зона контакта ограничена лишь областью сложноэфирной связи внутри молекулы Хл, связывающей порфириновое ядро с фитольным хвостом. В среднем доступная для растворителя площадь поверхности молекулы Хл равняется $7 \text{ \AA}^2$, что составляет менее одного процента от молекулярной поверхности данного пигмента. Предполагается, что такого рода изолированность пигмента способствует фотоустойчивости комплекса белка с Хл, поскольку она ограничивает вероятность прямого контакта молекулы Хл с молекулярным кислородом [Horigome et al., 2007].

Согласно данным компьютерного моделирования, «динамическое движение» и «дыхательная подвижность» молекул Хл могут способствовать проникновению воды в гидрофобный карман [Lemke et al., 2019]. Нельзя исключать, что в полость к пигментам

подобным образом могут диффундировать и другие небольшие молекулы, в том числе кислород [Lemke et al., 2019].

Два ароматических аминокислотных остатка, Trp-90 и Trp-154, контактируют в пределах досягаемости Ван-дер-Вальсовых взаимодействий с атомами макроцикла Хл С-7 и С-18 соответственно. Гипотетически данные аминокислотные остатки могут осуществлять тушение флуоресценции возбужденного Хл с помощью передачи электрона и последующей рекомбинации зарядов [Horigome et al., 2007].

Важной особенностью структурной организации Хл-белковых комплексов LvWSCP является то, что молекулы Хл в их составе организованы в виде димеров. Эти димеры имеют структуру «открытого сэндвича» с углом между плоскостями в 27 градусов. Фронтальные расстояния между плоскостями димеров варьируют от 5,7 Å на «закрытом» конце (кислород кетогруппы при С-131), до 10,7 Å на «открытом» конце (углерод метильной группы на С-2). Кратчайшее расстояние между карбоксиметильными группами димера составляет 3,6 Å. В результате такого тесного взаимодействия димер Хл можно рассматривать как единую супермолекулу с делокализованными электронными переходами, то есть как экситон-связанный димер. Фитольные хвосты молекул Хл, в свою очередь, ориентированы в центр гидрофобной полости, где они вступают в тесное гидрофобное взаимодействие друг с другом. Данное гидрофобное взаимодействие можно считать очень важным для сборки белка, поскольку при связывании молекул хлорофиллидов, т.е. в отсутствие данных хвостов, тетрамерный комплекс не образуется или нестабилен [Horigome et al., 2007].

Почти через 10 лет после опубликования трехмерной структуры LvWSCP (класс IIB) из *Lepidium virginicum*, в 2016 году, была опубликована трехмерная структура белка BobWSCP (класс IIA) из *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Структура данного белка оказалась неотличима невооруженным взглядом от ранее описанной структуры белка LvWSCP. Как и LvWSCP, BobWSCP представляет собой симметричный гомотетрамер, связывающий 4 молекулы Хл, которые упакованы в гидрофобной полости в виде двух экситонно связанных димеров [Bednarczyk et al., 2016]; однако структура белка BobWSCP проявляет и определенные различия по отношению к структуре белка LvWSCP. Так, в плане межсубъединичных взаимодействий у ПБК BobWSCP и ПБК LvWSCP различны интерфейсы взаимодействия двух димеров субъединиц друг с другом, вследствие чего у комплексов различается угол поворота одного димера относительно другого приблизительно на 60°. Что же касается характера пигмент-белковых взаимодействий, то наибольшая разница между LvWSCP и BobWSCP проявляется в области колец «D» и «A» молекулы Хл. Так, находящийся у LvWSCP в положении 38 аспарагин (N38) заменен в BobWSCP аланином в положении 34 (A34). Как следствие, консервативный остаток триптофана (LvWSCP - W154, BobWSCP - W151), который в LvWSCP связан водородной связью

с дельта-кислородом аспарагина N38, в BobWSCP образует альтернативную водородную связь с кислородом основной цепи A34. В итоге объемная триптофановая боковая цепь перемещается от кольца «D» Хл к кольцу «А» Хл и искривляет кольцо «А» относительно плоскости макроцикла Хл (рисунок 6). Также из-за замены двух остатков лейцина L44 и L91 (в LvWSCP) на фенилаланин и валин F40 и V89 (в BobWSCP) винильная группа кольца «А» Хл поворачивается на 180° вокруг связи C3–C31. Совокупно вышеописанное искривление плоскости макроцикла Хл (ранее описанное для белков фотосинтетического аппарата, но не для WSCP), поворот винильной группы Хл, а также другие отличия в аминокислотном окружении пигментов приводят к большому различию в расположении пика поглощения Q_y на спектрах поглощения холобелков LvWSCP и BobWSCP (663 нм и 673 нм, соответственно) [Bednarczyk et al., 2016].

По мере развития исследований появились альтернативные данные относительно степени влияния деформации макроцикла молекулы Хл на конечные спектральные свойства холобелков WSCP-II. С помощью квантово-механических расчётов было определено, что деформация кольца макроцикла не настолько велика, как её прежде описывали [Bednarczyk et al., 2016], и вызванные ей конформационные изменения вносят лишь 38% вклад в разницу положения пиков Q_y на спектрах поглощения у BoWSCP и LvWSCP. Остальные 62% обусловлены изменением электростатического окружения пигмента [Lahav et al., 2021]. В настоящее время методом компьютерных вычислений с проверкой их результата на полученных сайт-направленным мутагенезом препаратах холобелков построены модели, позволяющие относительно точно прогнозировать изменения в спектрах поглощения белков WSCP-II, вызванные изменениями в электростатическом окружении молекул Хл [Srivastava et al., 2021].

Стоит отметить, что описанная выше деформация макроцикла Хл в BoWSCP и изменение (по сравнению с LvWSCP) пигмент-белковых электростатических взаимодействий значительно влияют на распределение волновой функции именно синглетного возбужденного состояния Хл, но лишь незначительно отражаются на распределении волновой функции триплетного возбужденного состояния Хл [Agostini et al., 2020].

Обобщая изложенные данные, белках WSCP-II выделяют четыре важных для связывания Хл участка последовательности. Самый крупный из них представляет собой β -шпильку из примерно 17 остатков ($\approx$ с 31/35-го до 50/55-го а.о. с N-конца), которая проходит рядом с плоскостью макроцикла Хл и играет самую важную роль в его связывании. Второй участок представляет собой петлю, которая отходит от предыдущего участка ($\approx$ от 51/56-го до 60/65-го а.о с N-конца) и образует сеть водородных связей с карбонильными боковыми группами колец «D» и «E» Хл. Третий участок представляет собой петлю из 8-10 аминокислотных остатков ($\approx$ от 84/93-го до 93/104-го а.о с N-конца), взаимодействующую с кольцом «B» Хл, а четвертый - бета-

поворот из 4 или 3 аминокислотных остатков ($\approx$ от 150/173-го до 155/176-го а.о с N-конца), взаимодействующий с кольцом “А” Хл [Prabahar et al., 2020].

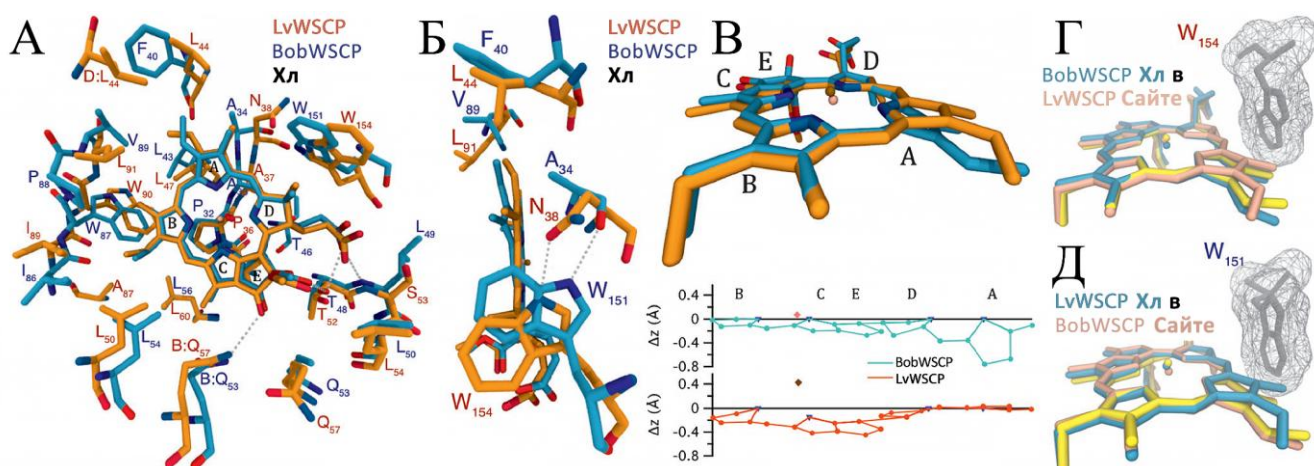


Рисунок 6. Пигмент-белковые взаимодействия в BobWSCP и LvWSCP. (А) – Хл и взаимодействующие с ним а.о. (Б) – Различия в расположении и конфигурации водородных связей остатка триптофана, искривляющего макроцикл Хл. (В) - Деформация кольца макроцикла Хл, связанного BobWSCP и LvWSCP, и график смещения атомов макроцикла данных Хл относительно плоскости. (Г) – Моделирование Хл из CauWSCP, помещенного в сайт связывания LvWSCP с помощью вычислительной механики «Assisted Model Building with Energy Refinement», (AMBER) (желтый). (Д) Аналогично (Г), но Хл из LvWSCP помещен в сайт связывания BobWSCP [Bednarczyk et al., 2016].

1.2.3. Пигментный состав, фотофизические и фотохимические свойства белков WSCP

1.2.3.1. Пигментный состав белков WSCP-I

Как и остальные белки семейства WSCP, белок CaWSCP (в том числе и полученный рекомбинантным путём) способен извлекать Хл не только из пигментных суспензий, но и из препаратов тилакоидов [Takahashi, Yoshikawa et al., 2013]. Количество молекул пигмента в составе комплекса в разных источниках варьирует от 7 молекул пигмента на холобелок [Takamiya, 1973; Satoh et al., 2001] до 4 молекул пигмента на тетрамерный комплекс [Noguchi et al., 1999; Takahashi, Seki et al., 2014; Takahashi, Uchida et al., 2014B]. Белок CaWSCP связывает предпочтительно Хл *a* и в меньшей степени Хл *b* (соотношение Хл *a* / Хл *b* = 6,2) [Oku, Tomita, 1975]. В современной литературе, на основании разницы молекулярных масс тетрамера и мономеров, преобладает версия, что связывание происходит в соотношении «одна молекула пигмента на одну субъединицу тетрамера». Однако данные рентгеноструктурного анализа, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, в литературе пока отсутствуют.

1.2.3.2. Механизмы связывания белками WSCP-II Хл и других пигментов

Белки WSCP-II могут как связывать Хл, растворённый в окружающей среде, так и извлекать Хл из препаратов мембран тилакоидов [Satoh et al., 1998; Takahashi et al., 2012]. Однако, как показано в опытах с белком LvWSCP, извлечение Хл из мембран тилакоидов происходит с относительно низким выходом полноценного тетрамера по сравнению с другими методами самосборки [Girr, Paulsen, 2021]. Предварительный прогрев тилакоидов, приводящий к денатурации находящихся в них комплексов, приводит к более высокому выходу холобелков LvWSCP, что указывает скорее на то, что апобелки LvWSCP не могут извлекать Хл из нативных, неденатурированных комплексов фотосинтетического аппарата, чем на то, что они способны делать это [Girr, Paulsen, 2021].

Эффективность извлечения Хл апобелками WSCP-II из мембран зависит от их липидного состава. Так, апобелок LvWSCP довольно успешно экстрагировал Хл из модельных мембран, состоящих из фосфатидилглицерола, но совершенно не экстрагировал его из мембран, содержащих фосфатидилхолин. Также белок экстрагировал Хл из содержащих МГДГ (моноголактозилдиацилглицерин) и ДГДГ (дигалактозилдиацилглицерин) мембран. Таким образом можно предположить, что галактолипиды, преобладающие в тилакоидной мембране ($\approx 80\%$), являются основными партнерами для взаимодействия с белками WSCP-II [Girr, Paulsen, 2021]. Взаимодействие белков WSCP-II с мембранными липидами осуществляется через кольцо гидрофобных аминокислот рядом с сайтом связывания молекул Хл. В LvWSCP к этим аминокислотам принадлежат, в том числе, и ранее упомянутые Trp-90 и Trp-154; мутационная замена данных а.о. сильно затрудняет процесс извлечения Хл из мембран [Girr, Paulsen, 2021]. В итоге можно выстроить следующую приблизительную последовательность экстракции Хл белками WSCP-II из мембран, подразделяющуюся на несколько стадий: ассоциация апобелка WSCP с мембраной, связывание Хл апобелком WSCP, экстракция Хл с помощью WSCP, тетрамеризация холобелка WSCP и его «отстыковка» от мембраны [Girr, Paulsen, 2021]. Отдельно хочется отметить, что белки WSCP-II не содержат каротиноидов и не могут их связывать в опытах *in vitro* [Schmidt et al., 2003].

Белки WSCP-II способны помимо Хл *a* и Хл *b* связывать другие хромофоры порфириновой природы. Бактериохлорофилл *a* связывается с апобелками WSCP подобно обычным молекулам Хл *a*. Производные Хл с центральным ионом Zn^{2+} вместо Mg^{2+} (Zn - феофитин *a*) также связываются с белками с образованием тетрамерного комплекса, но производные Хл с ионами меди (Cu - феофитин *a* и Cu – бактериофеофитин *a*) с белками WSCP не связываются. Всё это указывает на отсутствие у белков WSCP селективности относительно структурных деталей тетрапиррольного кольца и на критическую важность наличия центрального

пентакоординированного (Mg^{2+} или Zn^{2+}) иона в структуре пигмента для его связывания апобелками WSCP-II [Schmidt et al., 2003].

Исходя из результатов ранних исследований складывалось впечатление, что производные Хл с удаленным центральным ионом Mg^{2+} (феофитин *a* и феофеллид *a*) не связываются белками WSCP-II, а молекулы Хл без фитольной цепи (хлорофиллиды *a* и *b*) связываются с апобелками WSCP-II без формирования тетрамерного комплекса [Schmidt et al., 2003]. Однако, в более поздних работах удалось получить тетрамерные комплексы белков WSCP с хлорофиллидами (т.е. молекулами Хл без фитольного хвоста), которые начинали денатурировать при температуре выше 55 °C и быстро подвергались фотодеградации [Agostini et al., 2017; Bednarczyk et al., 2021]. Было показано, что сродство у белков BoWSCP и LvWSCP к хлорофиллидам заметно ниже, чем к молекулам Хл. Также была показана возможность связывания белками не имеющих центрального иона Mg^{2+} феофитинов *a* и *b*, однако сродство к ним было равным или еще более низким, чем к лишенным фитольного хвоста производным Хл. Из производных без центрального иона и фитола только LvWSCP обладает возможностью связывать феофорбид *b* с очень низкой аффинностью. Апобелок LvWSCP способен также связывать протохлорофиллид, Mg-протопорфирин IX, и даже гем *b* [Girr et al., 2020]. Возможность связывать хлорофиллиды показана и для белка AtWSCP [Bektas et al., 2012].

Суммируя вышеизложенные факты, можно сделать вывод, что для BoWSCP фитольный хвост и центральный ион Mg^{2+} вносят одинаковый вклад в силу связывания пигмента, а для связывания пигмента апобелком LvWSCP более важен центральный ион Mg^{2+} , а не фитольная цепь. При этом размер π -электронной системы макроцикла, пятое кольцо макроцикла и тип центрального пентакоординированного иона мало влияют на связывание пигмента с WSCP-II [Girr et al., 2020].

Полностью заполненный тетрамерный комплекс с четырьмя молекулами Хл формируется при избытке пигментов в окружающей среде. Однако при дефиците пигмента заполнение может быть неполным. Существование формы с двумя молекулами Хл вместо четырёх было впервые показано спектральными методами, но какие именно сайты связывания были заполнены – парные или непарные – оставалось неизвестно [Theiss et al., 2007]. В дальнейшем методом масс-спектрометрии было показано существование либо комплексов с заполненными двумя парными сайтами связывания пигмента (т.е. с одним димером), либо с заполнением всех четырёх сайтов в комплексе (т.е. с двумя димерами) [Palm et al., 2017]. В дальнейшем для апобелка BnD22 удалось детектировать два отдельных этапа связывания Хл, соответствующих образованию тетрамерных комплексов BnD22 с двумя и четырьмя связанными молекулами Хл соответственно [Bouargal et al., 2022]. В случае неполного заполнения сайтов связывания ПБК сохраняли устойчивость к термической диссоциации или денатурации, экстремальным значениям pH и фотоокислению

[Palm et al., 2017]. Остаётся дискуссионным вопрос, может ли уже собранный комплекс Хл – WSCP-II с двумя пустыми сайтами связывания включить в себя еще две молекулы Хл? В одних источниках сообщается, что возможно дозаполнение оставшихся двух сайтов связывания при контакте «неполных» комплексов с выделенными тилакоидами [Palm et al., 2017]. В других источниках тетрамерные комплексы переставали взаимодействовать с искусственными липосомами, составленными из входящих в состав тилакоидов липидов, и для некоторых исследователей представляется маловероятным, что поведение полностью и не полностью заполненного комплекса здесь будет различаться [Girt, Paulsen, 2021].

1.2.3.3. Спектральные свойства ПБК WSCP-II

Молекулы апобелка WSCP, не связавшие Хл или другой порфириноподобный пигмент, не поглощают свет в видимой части спектра и могут поглощать свет только в УФ-области с максимумом около 280 нм. Следовательно, спектры поглощения холобелков WSCP в видимом диапазоне светового спектра зависят исключительно от типа и количества связанных ими пигментов (с учётом влияния на пигменты белкового окружения). Коэффициент молярной экстинкции при 280 нм для белковых субъединиц в холобелках BoWSCP с Хл *a* оценивается как $25440 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$, а если комплекс образован с Хл *b* – $18900 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ [Palm et al., 2017].

Холобелки WSCP-II, содержащие одни и те же хромофоры (Хл *a* и Хл *b*), но разные белковые составляющие, имеют различия в спектрах поглощения. Типовой спектр поглощения белка WSCP-IIA (на примере белка из *Brassica oleracea* L. var *botrytis*) содержит пики поглощения при 673,0; 629,5; 437,0; 420,5; 383,0; 341,5 и 274,0 нм, при этом пик при 274 нм ниже пика при 673 нм [Nishio et al., 1997]. У белка из *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* дополнительно наблюдался пик поглощения при длине волны 698 нм, обусловленный предположительно химической модификацией молекулы Хл ещё до включения пигмента в комплекс [Shinashi et al., 2000; Satoh et al., 2001]. Типовой спектр поглощения белка WSCP-IIB (на примере белка из *Lepidium virginicum*) содержит пики поглощения при 663, 619, 469, 438, 419, 379, 338 и 272 нм, при этом, как и в случае BoWSCP, высота пика при 272 нм меньше, чем высота пика при 673 нм [Murata, Ishikawa, 1981; Takahashi, Yanai et al., 2013]. Помимо влияния на расположение пиков на спектрах поглощения, белковая составляющая Хл-белковых комплексов WSCP-II может влиять на значения коэффициентов молярной экстинкции их пигментной составляющей. Так, связанный белком BoWSCP Хл *a* имеет тот же коэффициент экстинкции в красном пике Q_y -перехода, что и в этаноле ($74400 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$), тогда как связанный с ним Хл *b* имеет коэффициент экстинкции в этом пике на 24% выше ($52450 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$), чем в этаноле ($40000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$) [Palm et al., 2017]. Связанный белком LvWSCP Хл *a* имеет более низкий коэффициент экстинкции в данном красном пике ($65800 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$), чем пигмент в этаноле ($74400 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$), тогда как связанный с ним Хл *b* имеет

коэффициент экстинкции в данном пике выше ($49000 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$), чем пигмент в этаноле ($40000 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$) [Palm et al., 2018].

Стоит отметить, что спектры поглощения одних и тех же комплексов WSCP могут иметь незначительные различия, например, в случае их выделения из растений разного географического положения. Так, в отличие от белка LvWSCP, полученного в Японии (см. выше), в спектрах препарата данного белка, полученных в штате Калифорния (США) местоположение основного пика поглощения находится при 661 нм, а не при 663 нм [Murata, Ishikawa, 1981].

Спектры эмиссии флуоресценции у холобелков WSCP-II по форме соответствуют спектрам эмиссии флуоресценции Хл *a* в ацетоне, но смещены в длинноволновую область. Так, если пик флуоресценции чистого Хл *a* в ацетоне наблюдается при 665 нм, комплексы из *Brassica oleracea* имеют пик флуоресценции при 682 нм, а комплексы из *Lepidium virginicum* – при 672 нм. У белков из *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *Raphanus sativus* var. *raphanistroides* и из *Lepidium virginicum* квантовый выход флуоресценции Хл *a* колебался от 0,173 до 0,185, что составляет примерно 58–62% от величины квантового выхода флуоресценции раствора Хл *a* в ацетоне [Bednarczyk et al., 2015]. Квантовый выход фотолюминесценции (Photoluminescence Quantum Yield, PLQY) для комплекса белка из *Lepidium virginicum* и Хл *a* был определен как равный 7,5% [Tsang et al., 2025].

1.2.3.4. Пигментный состав Хл-белковых комплексов WSCP-II

Различия между белками WSCP-II в родстве к тем или иным молекулам Хл и, как следствие, различие в пигментном составе Хл-белковых комплексов WSCP-II составляют одну из ключевых характеристик для разделения данных белков на подклассы IIA и IIB.

Молярное соотношение Хл *a* к Хл *b* в выделенных из растений *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* (WSCP-IIA) холобелках превышает 10 [Kamimura et al., 1997]. У холобелка из цветной капусты *Brassica oleracea* var. *botrytis* (WSCP-IIA) эта величина составляет 6,3 [Murata, Toda, et al., 1971], у холобелка из *Brassica nigra* (WSCP-IIA) – 8,0 [Murata, Murata, 1971]. Соотношение Хл *a* к Хл *b* в холобелках из *Lepidium virginicum* (WSCP-IIB) варьирует в зависимости от органа растения: так, в листьях оно составляло 1,5-1,7, а в стебле – 3,4-3,5 [Itoh et al., 1982]. Предположительно, данное различие обусловлено разным соотношением пигментов в тканях данных органов, а не структурными особенностями молекул белка.

Причину, по которой холобелки WSCP-II, выделенные из разных растений-источников, имеют различия в пигментном составе, удалось прояснить после того, как в 2016 году (в дополнение к уже известной структуре комплекса WSCP-IIB из *Lepidium virginicum*) была расшифрована трехмерная структура комплекса WSCP из *Brassica oleracea* var. *botrytis*, относящегося к подклассу IIA. Оказалось, что предпочтительное родство к той или иной

разновидности Хл формируется в петле 87-PVCNEL-94 (LvWSCP) или 90-LCPS-96 (BoWSCP), расположенной в непосредственной близости от кольца «В» связанного пигмента. Замена данной петли на петлю из белка другого подкласса может привести, соответственно, либо к усилению сродства к Хл *b* у белков подкласса ПА, либо к ослаблению такого сродства у белка подкласса ПВ [Palm et al., 2018; Agostini et al., 2019]. Принципиальное значение для проявления этих различий имеет, по-видимому, «теснота» молекулярного окружения вокруг кольца «В» Хл, а также наличие или отсутствие доноров водородных связей рядом с углеродом С-71 Хл (который в Хл *b* формилирован) на достаточно малом для реализации связи расстоянии. Если молекулярное окружение слишком «тесно» для формильной группы Хл *b*, а доноры водородной связи рядом с ней отсутствуют, то связь будет устанавливаться преимущественно с Хл *a* [Palm et al., 2018; Agostini et al., 2019].

Важно отметить, что итоговое соотношение Хл *a* к Хл *b* в холобелках WSCP-II, которые не были выделены непосредственно из растительного материала, может зависеть от условий самосборки апобелка с Хл *in vitro*, например, от вида растворителя для пигмента или способа доставки пигмента к белку [Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013]. Поэтому для корректной интерпретации данных о пигментном составе полученных *in vitro* комплексов очень важно учитывать условия осуществления их самосборки и способ доставки Хл к белку.

Наиболее успешными в этом плане оказались опыты по самосборке белков WSCP в водно-масляной эмульсии, которые позволили относительно просто и эффективно осуществлять самосборку комплексов путём смешивания водорастворимого белка и нерастворимых в воде пигментов. Именно с помощью этого варианта самосборки были получены первые данные о сходном строении четырёх клонированных белков (из *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *Raphanus sativus* var. *raphanistroides* и из *Lepidium virginicum*), согласно которым тетрамерные комплексы данных белков обладают молекулярной массой 80 кДа и связывают до четырёх молекул Хл [Bednarczyk et al., 2015]. При этом анализ точного соотношения Хл *a* к Хл *b*, как и количества данных пигментов на молекулу белка, затруднен тем, что Хл не полностью извлекается из нативных препаратов белков WSCP-II даже при обработке 80% ацетоном, протеиназой К, а также при использовании более «агрессивного» по отношению к пигментам 2-бутанона [Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013].

1.2.3.5. Организация молекул Хл в ПБК WSCP-II

Образовывать тетрамерные Хл-белковые комплексы с эквимольным соотношением Хл-белок способны все белки WSCP-II, не относящиеся к подклассу «II X» [Bednarczyk et al., 2015]. Ещё в восьмидесятых-девяностых годах прошедшего века на основе анализа спектров флуоресценции и их изменения под воздействием встраивающегося между белковыми цепями

додецилсульфата натрия были высказаны первые предположения о возможности миграции энергии между молекулами Хл в белке [Tabata et al., 1983; Satoh et al., 1998]. На это же указывали и спектры кругового дихроизма в красной области спектра, на которых у белков WSCP-II присутствуют два симметричных, но разнонаправленных пика поглощения, характерных для очень близкого взаимодействия молекул Хл в холобелке [Tabata et al., 1983; Schmidt et al., 2003]. Данное предположение окончательно подтвердилось после опубликования первой трехмерной структуры белка WSCP-IIВ из *Lepidium virginicum* [Horigome et al., 2007].

Тема энергетического взаимодействия пигментов друг с другом является дискуссионной. Синглетное возбужденное состояние Хл делокализовано между двумя пигментами в составе димера, но время его жизни не уменьшено по сравнению со свободным Хл [Schmitt et al., 2008]. Триплетное возбужденное состояние Хл, в отличие от синглетного, локализовано только на одном пигменте в составе димера, но при этом присутствие данного состояния на одном пигменте влияет на распределение силы осциллятора в остальных трех Хл в составе комплекса. Другими словами, два димера Хл внутри комплекса не изолированы энергетически друг от друга [Agostini, Palm et al., 2018] и в некоторых аспектах могут рассматриваться как тетрамер с существенными связями между всеми четырьмя пигментами [Fresch et al., 2020]. Четыре сайта связывания Хл в комплексах WSCP-II, благодаря симметрии комплекса, эквивалентны, и триплетное состояние локализуется на любой из молекул Хл в холобелке с одинаковой вероятностью [Ciuti et al., 2022].

По данным литературы, в белках WSCP встречаются, как пары разных гомодимеров «Хл *a* – Хл *a*» и «Хл *b* – Хл *b*», так и гетеродимеры «Хл *a* – Хл *b*» [Schmitt et al., 2008].

1.2.4. Фотохимическая активность белков WSCP

1.2.4.1. Фотоконверсия Хл в составе белка WSCP-I

Как уже упоминалось, классифицирующим признаком для белков WSCP-I служит способность претерпевать фотоконверсию, т.е. под воздействием светового облучения изменять свой спектр поглощения. В соответствии с длиной волны пиков поглощения, находящихся в красном диапазоне длин волн, форма не претерпевшего фотоконверсию белка называется CP668, а фотоконвертированная форма - CP743 (или CP740/CP742) [Oku et al., 1972B]. В спектрах поглощения фотоконвертированной формы белка CP743 менее выражены пики поглощения при 668 и 429 нм (по сравнению с CP668), однако в них дополнительно присутствуют пики поглощения при 364, 399, 567 и 743 нм [Oku et al., 1972A]. Следует отметить, что реакция фотоконверсии происходит только в присутствии кислорода [Nagar et al., 1979], а также при доступе воды - в лиофилизированном препарате комплекса фотоконверсии не происходит [Oku et al., 1972A]. При этом фотоконверсию претерпевают лишь входящие в состав комплекса молекулы Хл *a*, но не молекулы Хл *b* [Noguchi et al., 1999]. Есть данные, указывающие на

возможность фотоконверсии CP668 в CP743 в отсутствие кислорода, но в присутствии вместо него феррицианида [Oku, Tomita, 1975].

Достоверно известно, что фотоконверсия является фотохимическим процессом, и изменение спектра поглощения является следствием изменения структуры молекул хромофора. Предполагается, что в ходе фотоконверсии Хл возбуждается светом и в триплетном состоянии продуцирует АФК, которые затем могут вступить в реакцию с неконвертированным Хл *a* из CP668 и превратить его в новый пигмент P743 [Oku et al., 1972A; Nagar et al., 1979; Satoh et al., 2001]. Во время данного превращения, предположительно, происходит атака кислорода на C7-C8 двойную связь кольца «В» Хл *a*, приводящая к её окислению [Hirabayashi et al., 2006]. Пигмент белка CP743 при попытке выделения превращается в другие моноокисленные варианты Хл *a*, получившие названия P726 и P700 (рисунок 7) [Hirabayashi et al., 2006]. Показано, что расположение C=C связей в пигменте P743 совпадает с расположением C=C связей в бактериохлорофилле *a*, а спектр поглощения пигмента P743 имеет наибольшее сходство со спектром поглощения бактериохлорофилла *g* [Noguchi et al., 1999; Satoh et al., 2001]. При этом в белке происходят лишь локальные изменения структуры в боковых радикалах аминокислот, а значительных структурных изменений он не претерпевает [Noguchi et al., 1999].

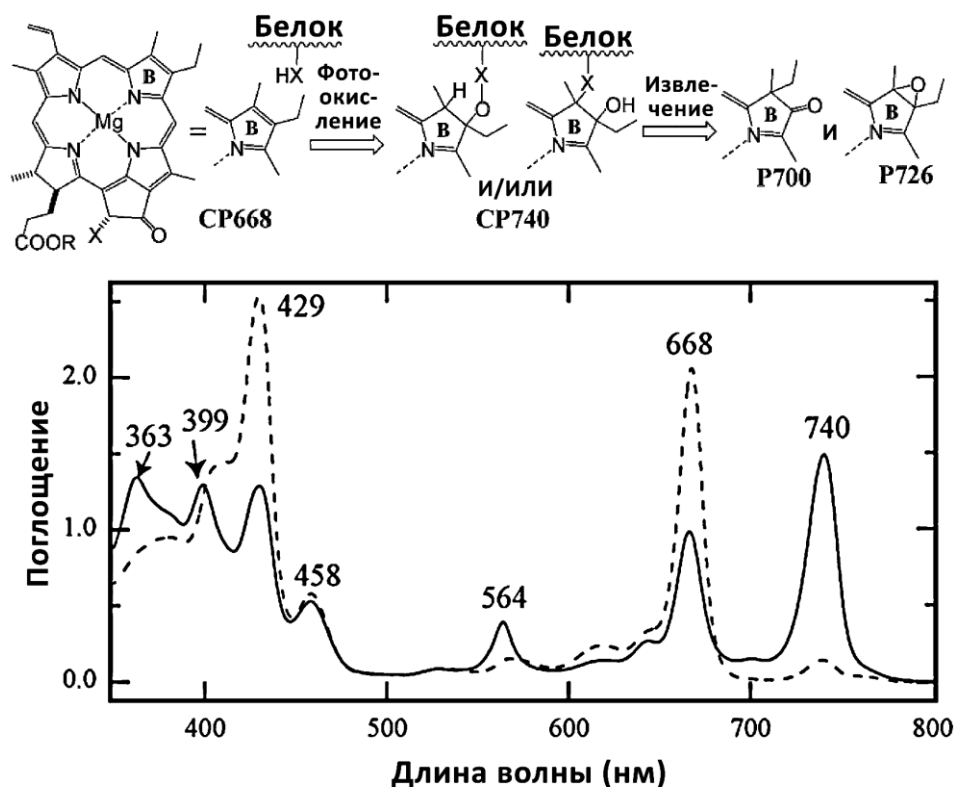


Рисунок 7. Спектры поглощения комплекса CaWSCP до фотоконверсии (CP668, пунктирная линия) и после неё (CP740, сплошная линия), а также схема предполагаемых превращений Хл *a* в ходе его фотоконверсии и последующего выделения из белка [Hirabayashi et al., 2006].

Квантовый выход фотоконверсии CP668 в CP743 невысок и под действием света с длиной волны 670 нм оценен в 0,7 % [Nagar et al., 1979]. Реакция фотоконверсии происходит в пределах pH 0,2-11,8 с оптимальным pH 5,0; при этом в максимально кислых условиях (pH 0,2) вместо формы CP743 образовывалась иная форма комплекса, CP765, с пиком поглощения при 765 нм [Oku et al., 1972A]. Фотоконверсия происходит в три этапа, которые имеют различные скорости протекания и в ходе каждого из которых преобразуется по одной молекуле Хл *a*. По их завершению из четырех молекул Хл *a* в составе предполагаемого тетрамера CaWSCP только три претерпевают фотоконверсию, а одна молекула её избегает (рисунок 8) [Takahashi, Uchida et al., 2014A]. Показано, что наиболее эффективно фотоконверсия протекает при облучении светом с длиной волны 430 нм, но она также может протекать и при воздействии излучения из красной или зеленой областей спектра [Takahashi, Uchida et al., 2014A].

Показан перенос энергии от нефотоконвертированных молекул Хл на фотоконвертированный пигмент P743 [Goedheer et al., 1977], однако касательно возможности обратного переноса энергии (от P743 на Хл) в литературе имеется противоречивая информация. В одном источнике возможность данного переноса опровергается [Nagar et al., 1979], а в другом – находит косвенное подтверждение в виде демонстрации возможности перевода частично фотоконвертированного белка CP668 в форму CP743 с помощью облучения в области 735 нм [Takahashi, Uchida et al., 2015]. С учётом отсутствия поглощения в области 735 нм у Хл *a* в составе CaWSCP можно предположить участие уже фотоконвертированных пигментов в фотоконверсии оставшихся молекул Хл *a*.

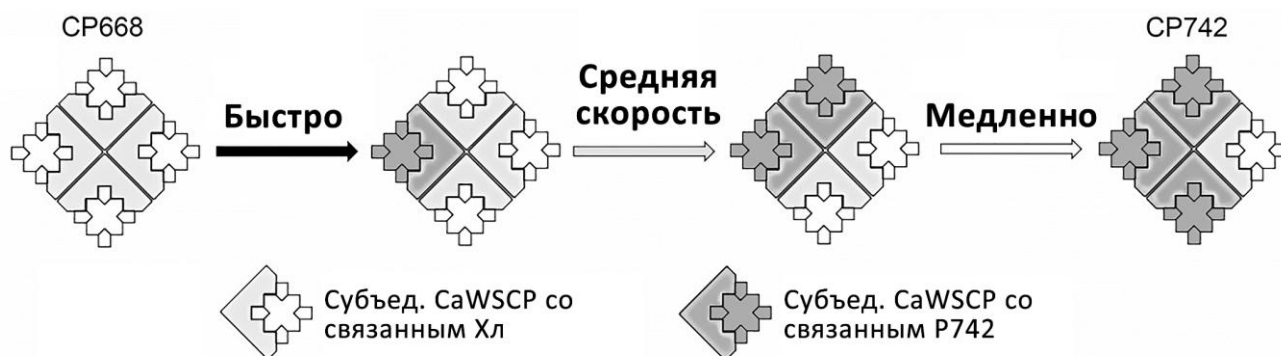


Рисунок 8. Схематическое изображение стадий фотоконверсии от CP668 до CP742 [Takahashi, Uchida et al., 2014A].

Выявленная экспериментально возможность ингибирования процесса фотоконверсии добавлением KI [Oku, Tomita, 1975] первоначально позволила предположить участие в данном процессе а.о. тирозина. Однако полный мутагенез всех остатков тирозина в белке не только не блокировал фотоконверсию, но и не убирал эффект ингибирования. Это говорит о том, что механизм данного ингибирования не включает в себя «атаку» KI на а.о. тирозина [Takahashi, Seki

et al., 2015]. Для связывания Хл и его фотоконверсии обязательно присутствие дисульфидного мостика между остатками Cys-2 и Cys-30; замена других остатков цистеина не влияет на связывание Хл и его фотоконверсию [Takahashi, Seki et al., 2014].

Способность к фотоконверсии сохраняется даже после кратковременной термической обработки белка при 100 °С, однако после 30 минут такой термообработки активной остается лишь 1/5 часть белка [Oku et al., 1972B]. Известно, что Хл-белковые комплексы CaWSCP обладают устойчивостью к таким реагентам, как 8 М мочевины, 5% Triton-X100 и 10 мМ EDTA [Oku et al., 1972A]. В то же время обработка восстанавливающими агентами типа β-меркаптоэтанола или дитиотреитола подавляет возможность связывать Хл [Oku, Tomita, 1975; Takahashi, Seki et al., 2014].

Фотоконверсия CP668 в CP743 обратима при облучении светом в области 735 нм с добавлением 10 мМ гидросульфата [Takahashi, Uchida et al., 2015] или аскорбиновой кислоты, причём данный обратный процесс CP743 => CP668 усиливается в области высоких (щелочных) значений pH [Oku, Tomita, 1975]. При низком значении pH полученный таким образом обратно-фотоконвертированный CP668 больше не трансформировался в CP743 [Oku, Tomita, 1975]. Сообщалось также, что обращать процесс фотоконверсии в темноте способен гидросульфит, однако эти данные в дальнейшем не получили подтверждения [Takamiya et al., 1963; Takahashi, Uchida et al., 2015]. Спектр поглощения обратно-фотоконвертированного белка оказался сходным со спектром поглощения Хл *a*, но в нём присутствовал дополнительный пик при 763 нм. Тот факт, что обратно-фотоконвертированный белок не был способен к повторной фотоконверсии, возможно свидетельствует о том, что он представляет собой совершенно новый белковый комплекс, получивший название CP763. Соотношение пиков в спектре поглощения говорит о том, что из трех фотоконвертированных Хл один всё же может восстанавливаться обратно до Хл *a*, но остальные два преобразуются в новый пигмент с пиком поглощения 763 нм [Takahashi, Uchida et al., 2015]. Структура этого пигмента неизвестна, но её расшифровка может в будущем стать крайне важным открытием для дальнейшего выяснения механизмов фотохимических реакций в CaWSCP.

1.2.4.2. Фотосенсибилизация химических реакций Хл в белках WSCP и роль АФК

Фотохимическая активность белков WSCP-I не ограничивается способностью к фотоконверсии. Для белков WSCP-I (но не для филогенетически неродственных им белков WSCP-II) выявлена способность фотосенсибилизировать окислительно-восстановительные реакции. Так, в самом первом исследовании, посвященном данным белкам, было показано, что холоформа CaWSCP (как до, так и после фотоконверсии) способна окислять цитохром 553 из

водородсней [Yakushiji et al., 1963]. Также этот холобелок способен фотовосстанавливать пластохинон в присутствии аскорбиновой кислоты [Oku et al., 1972A].

Отдельно стоит упомянуть о фотохимических опытах Matsuzaki и соавт. (1975), в ходе которых они с помощью фотоконвертированной формы CaWSCP (CP743) окисляли на свету в присутствии менадиона и кислорода воздуха выделенный из *Brassica komatsuna* (*Brassica rapa* var. *perviridis*) цитохром *f*. При освещении этого же белка в отсутствие кислорода воздуха наблюдали обратный процесс – восстановление цитохрома *f* [Matsuzaki et al., 1975].

В отличие от холобелков WSCP-I, холобелки WSCP-II ранее не исследовались подробно на способность фотосенсибилизировать окислительно-восстановительные реакции, а экстраполировать фотохимические свойства холобелков класса I на холобелки класса II невозможно из-за существенного их различия в структуре. К моменту создания данной диссертационной работы представления относительно фотохимической активности холобелков WSCP-II ограничивались лишь доступными сведениями о возможности (или невозможности) генерации ими $^1\text{O}_2$.

Первые опыты по проверке такой возможности были выполнены в начале 2000-х годов с использованием ловушки для $^1\text{O}_2$ – (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксила (TEMPO). Было показано, что холобелки BoWSCP генерируют $^1\text{O}_2$, но в 4 раза слабее по сравнению со свободными молекулами Хл. При этом фотовыцветание молекул Хл в составе холобелков BoWSCP также происходило медленнее, чем фотовыцветание свободного Хл [Schmidt et al., 2003]. На основе этих данных была предложена гипотеза, согласно которой холобелок BoWSCP можно рассматривать как «аварийный» сборщик Хл или транспортный белок для Хл или его предшественников, обеспечивающий их безопасное для клетки хранение и транспорт в водной среде [Schmidt et al., 2003]. При этом в данном исследовании не был получен ответ на вопрос, каким образом осуществляется защита Хл и происходит снижение скорости генерации им АФК.

На основании результатов расшифровки трехмерной структуры белка LvWSCP [Horigome et al., 2007] впервые были предложены три механизма, посредством которых этот белок мог бы обеспечивать сохранность пигмента и уменьшать генерацию АФК в отсутствие каротиноидов. Согласно этим гипотетическим механизмам: (1) Существование Хл именно в виде экситон-связанных димеров обеспечивает быстрое тушение возбужденных состояний Хл; (2) Тушение возбужденных состояний Хл происходит за счёт обмена электронами с находящимися рядом двумя а.о. триптофана; (3) Физический барьер в виде белковой молекулы изолирует возбужденный Хл от молекул внешней среды и молекул растворителя [Horigome et al., 2007].

Вклад упаковки Хл в виде экситон-связанного димера со свободным обменом энергией в процесс тушения возбужденных состояний пигмента был исследован в 2008 году. Было продемонстрировано, что димерная структура Хл типа «открытый сэндвич» не действует в

WSCP-II как тушитель синглетного возбужденного состояния данных пигментов, а само время жизни данного возбужденного состояния в этих димерах не уменьшено по сравнению со свободным Хл или Хл в мицеллах [Schmitt et al., 2008]. После этого в литературе фигурировали гипотезы, согласно которым либо (1) происходит делокализация именно триплетного возбужденного состояния и, как следствие, сокращение его времени жизни, либо (2) Хл в триплетном состоянии надежно изолирован белком WSCP от молекул кислорода, либо (3) энергия триплетного возбужденного состояния слишком низка для взаимодействия с кислородом и генерации АФК.

Новые данные, полученные спустя почти 15 лет после самой первой оценки скорости продукции $^1\text{O}_2$ холобелками WSCP-II [Schmidt et al., 2003], поставили под сомнение ранее устоявшиеся данные о сниженной скорости генерации АФК данными холобелками, а также предположения об их защитных механизмах. Было продемонстрировано, что триплетное возбужденное состояние Хл не делокализуется в димере и остаётся на одной молекуле пигмента из двух. При этом время жизни данного локализованного триплетного возбужденного состояния не понижено по сравнению с Хл в растворе и, более того, оно зависит от концентрации кислорода в растворе [Agostini et al., 2017]. Agostini и соавт. (2017) также продемонстрировали (в противоположность более ранним данным Schmidt и соавт. (2003)), что связанные в холобелке WSCP-II молекулы Хл являются не менее активными в плане генерации $^1\text{O}_2$, чем свободные молекулы пигмента. При этом они проявляют более высокую устойчивость к фотовыцветанию по сравнению со свободным Хл [Agostini et al., 2017]. Пониженная генерация АФК холобелками BoWSCP в предыдущих исследованиях была обусловлена, по их словам, тем фактом, что использовавшийся в них TEMPO является гидрофобной молекулой и неравномерно распределялся между водной фазой и липидной фазой додецил-бета-D-мальтозида. Как следствие, результаты, полученные с TEMPO, отличались в несколько раз от более новых результатов, полученных с использованием водорастворимого флуоресцентного сенсора $^1\text{O}_2$ «Singlet Oxygen Sensor Green» (SOSG) [Agostini et al., 2017].

Возникает вопрос: если молекулы Хл в составе WSCP-II являются активными генераторами $^1\text{O}_2$, то чем тогда обусловлена их собственная устойчивость к фотодеградации? Было показано, что два а.о. триптофана, находящиеся рядом с молекулой Хл в холобелке, никак не участвуют в защите данного пигмента от фотоокисления. Однако большую важность в этой защите имеют фитольные хвосты самих молекул Хл, физически закрывающие доступ к их чувствительным сайтам для молекул АФК. Пример отсутствия работы данного механизма демонстрируется в виде быстрого фотовыцветания комплексов WSCP-II с хлорофиллидами, не имеющими фитольных хвостов [Agostini et al., 2017]. При этом значение имеет не только само наличие фитольного хвоста, но и его конформация. Сайт-направленная мутационная замена

одного аминокислотного остатка в LvWSCP (Leu-91-Pro) на менее объемный приводит к изменению положения фитильного хвоста Хл таким образом, что он более не прикрывает чувствительные к кислороду сайты, в результате чего фотодеградация Хл в комплексе ускоряется [Palm et al., 2019]. Предположительно, вызванная аминокислотной заменой реорганизация фитильных цепей формирует канал, обеспечивающий доступ $^1\text{O}_2$ к метину или иону магния молекулы Хл [Palm et al., 2019].

Можно заключить, что фотохимические свойства белков семейства WSCP освещены в неодинаковой степени для двух его неродственных классов, I и II. Белки WSCP-I, относящиеся к семейству DUF538 и в отношении которых отсутствуют данные о строении ПБК, хорошо описаны в плане фотохимической активности, проявляющейся в виде фотоконверсии пигмента [Oku et al., 1972AB]. Была также показана фотохимическая активность данных белков и по отношению к веществам в растворе, а именно способность комплексов CaWSCP осуществлять окисление и восстановление экзогенных доноров и акцепторов электрона, в том числе цитохромов [Yakushiji et al., 1963; Oku et al., 1972A; Matsuzaki et al., 1975].

Что же касается белков WSCP-II, которые относятся к белкам-ингибиторам протеиназ Кунитц-типа, то они не обладают свойством фотоконверсии и ранее не были исследованы на предмет наличия у них фотохимической активности. Ранее было установлено, что способность генерировать $^1\text{O}_2$ у данной группы белков ослаблена в четыре раза по сравнению со свободными молекулами Хл [Schmidt et al., 2003], а также была показана изолированность димеров Хл от молекул растворителя [Horigome et al., 2007; Bednarczyk et al., 2016], что совокупно, казалось бы, указывало на отсутствие у них фотохимической активности. Данное предположение, однако, было поставлено под сомнение после того, как Agostini с соавторами в 2017 году продемонстрировали, что димеры Хл в комплексах белков WSCP-II генерируют АФК не менее активно, чем свободные молекулы Хл. Таким образом, димеры Хл в WSCP-II, даже несмотря на их изоляцию от внешней среды в этих белках, потенциально могут взаимодействовать в растворе как с молекулами окислителей и восстановителей, так и с кислородом. Из данного предположения возникает необходимость полноценного исследования белков WSCP-II на предмет наличия у них фотохимической активности при взаимодействии с экзогенными донорами и акцепторами электрона.

1.2.5. Организация Хл в белках WSCP; Конвергентное сходство со «специальной парой» реакционных центров фотосистем

Поскольку целью диссертационной работы является исследование фотохимической активности холобелков WSCP-II, а молекулы Хл в этих белках организованы в виде димеров, то возникает вопрос о том, насколько эти димерные структуры сходны или различны по отношению

к димерам реакционных центров фотосинтетических систем, факт фотохимической активности которых хорошо известен.

Как известно, именно реакционный центр фотосистем является ключевым элементом фотосинтетического аппарата, который за счёт переданной ему или поглощенной им энергии света осуществляет первичное разделение зарядов, заканчивающееся, в итоге, передачей электрона по цепи переносчиков и образованием молекул NADPH и АТФ. По существу, именно на этой стадии происходит преобразование энергии возбужденного электронного состояния светопоглощающего пигмента в энергию химических связей внутри биомолекул. Сам процесс фотосинтеза был «изобретен» живыми организмами приблизительно 3,5 - 3,8 миллиардов лет назад [Blankenship, 2010], а кислородный вариант фотосинтеза - примерно 2,8 миллиардов лет назад [Hohmann-Marriott, Blankenship, 2011].

В настоящее время все реакционные центры фотосистем подразделяют на два типа, называемые ФС I и ФС II, которые различаются строением и набором кофакторов [Blankenship, 2010]. Согласно современным представлениям, данные два типа реакционных центров произошли от одного общего эволюционного предка и имеют единый план структурной организации в контраст антенным комплексам и механизмам фиксации углерода, которые за аналогичное эволюционное время возникали неоднократно и независимо в различных группах организмов [Blankenship, 2010].

Фотосистема II, в зависимости от объекта и метода очистки, состоит из приблизительно 30 различных полипептидов, среди которых около 12 полипептидов обладают массой 3-5 кДа (рисунок 9). Главный элемент фотосистемы – «специальная пара» – является димером Хл *a* и по положению пика поглощения называется P_{680} . За связывание данного реакционного центра фотосистемы II ответственны субъединицы D1 и D2 массой около 39 кДа, которые также участвуют в связывании двух следующих за «специальной парой» Хл, двух феофитинов, первичного и вторичного хинонов (PQ_A и PQ_B), негемового железа (связанного с четырьмя гистидинами), а также двух антенных Хл [Скулачёв и др., 2010].

Отличительной чертой фотосистемы II является способность извлекать электроны из воды, что требует окислительно-восстановительный центр с более электроположительным восстановительным потенциалом, чем у пары $O_2/2H_2O$ (+0,81 В). Таким центром как раз является специальная пара P_{680}^+/P_{680} , чей восстановительный потенциал оценивается в +1,3 В. Между специальной парой и марганцевым кластером окисления воды находится промежуточное звено - боковая цепь аминокислоты тирозина (Y161), за счёт переноса электронов с которого P_{680} восстанавливается после первичного разделения зарядов. Таких тирозинов два (по одному на Хл специальной пары), но в переносе электронов участвует лишь один тирозин (YZ), а второй (YD) не функционален. Конечным акцептором электрона в фотосистеме II является хинон PQ_B ,

который после полного восстановления отсоединяется от фотосистемы и переносит электроны на следующие элементы фотосинтетической редокс-цепи [Nicholls et al., 2013; Blankenship, 2002].

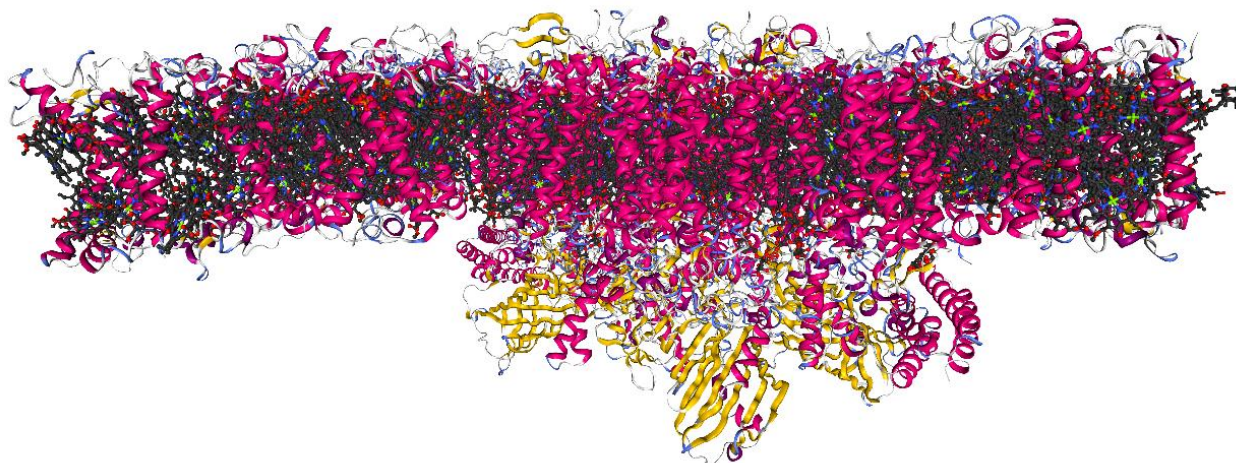


Рисунок 9. Суперкомплекс фотосистемы II и антенных белков LHCII из *Pisum sativum* (PDB ID: 5XNL). Белковые α -спирали выделены розовым, β -слои выделены желтым, молекулы Хл выделены черным [Su et al., 2017].

Фотосистема I включает в себя 14 различных полипептидов (рисунок 10). «Специальная пара» в данной фотосистеме также является димером молекул Хл *a* и называется P_{700} . Редокс-потенциал данной пары P_{700}^+/P_{700} разительно отличается от потенциала специальной пары фотосистемы II (P_{680}^+/P_{680}) и оценивается в -1,26 В. За счёт энергизации квантом света электрон от специальной пары передаётся последовательно на два одиночных Хл (А и А0), далее на хинон А1 (присутствуют симметрично, в двух экземплярах), а затем, через цепочку из трех FeS-кластеров, попадает на водорастворимый белок ферредоксин. «Специальная пара» же восстанавливается после отдачи электрона за счёт водорастворимого медьсодержащего белка пластоцианина, приходящего с ближней стороны мембраны [Скулачёв и др., 2010; Nicholls et al., 2013; Blankenship, 2002].

В вышеизложенном описании важно подчеркнуть, что в состав фотосистемы I входит около 100 молекул Хл и 12–16 молекул каротиноидов, связанных с основными белками, а в состав основных белковых комплексов фотосистемы II - от шести до восьми пигментов [Nicholls et al., 2013; Blankenship, 2002]. Иными словами, оба типа фотосистем (I и II) представляют собой очень большие и сложноустроенные белковые комплексы со множеством связанных пигментов, каждый из которых имеет зачастую свой уникальный сайт связывания. Пигменты эти, важно отметить, тесно взаимодействуют между собой и формируют либо функциональную цепь передачи энергии возбуждения на специальную пару, либо цепь отвода и диссипации в тепло

лишней/неиспользованной энергии от неё, либо цепь передачи электрона после расщепления зарядов.

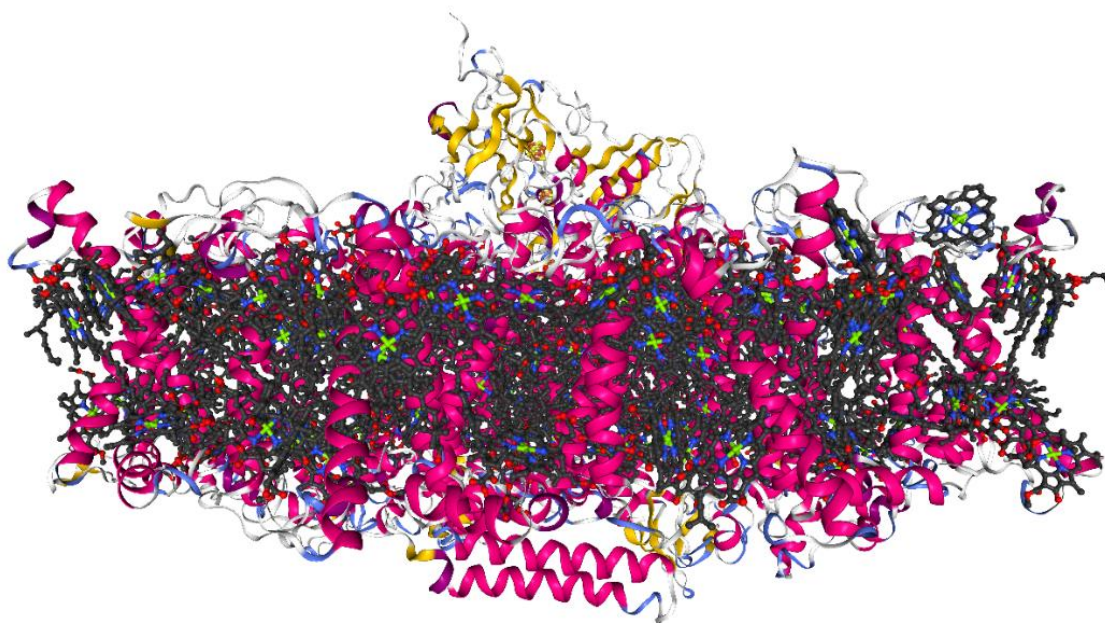


Рисунок 10. Фотосистема I из *Pisum sativum* (PDB ID: 4Y28). Белковые α -спирали выделены розовым, β -слои выделены желтым, молекулы Хл выделены черным [Mazor et al., 2015].

Белки WSCP-II, в сравнении с фотосистемами I и II, имеют гораздо более простую структуру. В их состав входят единообразные белковые молекулы, организованные в виде симметричного гомотетрамера, который связывает четыре молекулы Хл, размещенные в гидрофобной полости в виде двух димеров [Bednarczyk et al., 2016]. Данные димеры имеют структуру типа «открытый сэндвич» с углом между плоскостями в 27° (в фотосистемах же молекулы Хл в «специальной паре» расположены параллельно) [Horigome et al., 2007]. При этом, если в случае фотосистем имеются данные об обмене энергией возбуждения между «специальной парой» и её пигментным окружением, то в случае белков WSCP-II неизвестно, способен ли димер Хл обмениваться энергией со своим соседним димером молекул Хл или с молекулами вне холобелка.

Помимо различий в структуре комплексов, между фотосистемами I/II и холобелками WSCP-II имеются различия и в «энергетическом устройстве» димеров Хл. Речь идёт о том, что конфигурация димеров Хл типа «открытый сэндвич» в белках WSCP-II имеет такое распределение силы осциллятора, при котором доминирующей является его высокоэнергетическая экситонная полоса. Такая ситуация разительно отличается от распределения силы осциллятора в «специальных парах» Хл в фотосинтетических реакционных центрах, поскольку в них большую часть силы осциллятора несет низкоэнергетическая экситонная полоса. Такое распределение силы осциллятора в пользу полосы высоких энергий,

согласно литературе, может приводить к удлинению времени жизни синглетного возбужденного состояния Хл в холобелках WSCP-II с соответствующим увеличением вероятности исхода его в триплетное состояние [Agostini et al., 2017; Agostini, Palm et al., 2018; Hughes et al., 2006]. Другими словами, димер Хл в холобелках WSCP может быть энергетически адаптирован для того, чтобы его синглетное возбужденное состояние как можно чаще переходило в триплетное [Agostini et al., 2017; Agostini, Palm et al., 2018]; эта особенность имеет принципиальную важность в свете вопроса о возможной генерации $^1\text{O}_2$ белками WSCP.

Следует подчеркнуть, что организация молекул Хл в белках WSCP-I на данный момент остаётся неизвестной, поэтому данная группа белков в этой подглаве не обсуждается. Несмотря на то, что первые кристаллы белка CaWSCP для рентгеноструктурного анализа были получены ещё в 2007 году [Ohtsuki et al., 2007], его трехмерная структура до сих пор не опубликована.

1.2.6. О физиологических функциях белков WSCP-I и II

Сведения о физиологических функциях белков семейства WSCP носят в значительной степени фрагментарный характер и могут сильно различаться для белков WSCP разных классов. Можно лишь с достаточной уверенностью утверждать, что эти белки, несмотря на присутствие молекул Хл в их структуре, не участвуют в процессах преобразования энергии в фотосинтезе. В литературе нет прямых или косвенных указаний на такого рода функциональную активность белков WSCP, а также подчеркнут факт внехлоропластной локализации белков WSCP-II в растительной клетке.

Поскольку белки WSCP-I имеют в своём составе домен DUF538, целесообразно рассматривать их функции в связи с доступной информацией о функциях белков семейства DUF538. Использование инструментов аннотации геномов позволило описать белки с доменом DUF538 преимущественно как специфические продукты экспрессии стресс-индуцируемых генов растений, активируемых, например, дефицитом питательных веществ, образованием корончатых галлов, умеренной засухой или действием смешанных элиситоров [Gholizadeh, 2015]. При этом у животных, грибов, простейших, а также у зеленых и красных водорослей и прокариот белки DUF538 обнаружены не были [Gholizadeh, 2015].

Биоинформатическими методами выявлено наличие определенной гомологии белков DUF538 (причем как в аминокислотной последовательности, так и в плане вторичной и третичной структуры) с ферментами, катализирующими гидролиз сложноэфирных связей — эстеразами и хлорофиллазами [Gholizadeh, 2015]. Принимая во внимание эту информацию и рассматривая Хл как ароматический эфир карбоновой кислоты, было высказано предположение о функционировании белков семейства DUF538 в качестве гидролаз, перерабатывающих молекулы Хл в растениях, переживающих стрессовые условия [Gholizadeh, 2015]. Данное

предположение получило частичное подтверждение в опытах *in vitro*: оказалось, что белки DUF538 из *Celosia cristata* и CaWSCP ускоряли *in vitro* процесс распада Хл в тестовых образцах по сравнению с контрольными образцами без данных белков, при этом параллельно в пробе происходило накопление антиоксидантных веществ [Gholizadeh, 2015; Gholizadeh, 2016]. Согласующиеся результаты были получены и в опытах *in vivo* в образцах листьев, подвергнутых засухе: уровень экспрессии генов DUF538 увеличивался в 1,2, 1,6 и 2,8 раза при снижении содержания Хл до уровня 77 %, 68 % и 50 % от исходного соответственно [Gholizadeh, 2015]. Результаты этих экспериментов позволяют предположить, что семейство белков DUF538 может участвовать в распаде Хл *in vivo* с одновременным накоплением антиоксидантных соединений [Gholizadeh, 2015]. Впоследствии была продемонстрирована возможность функционирования белков DUF538 как метилэстераз, субстратом для которых служит пектин [Gholizadeh, 2020].

Сведения о локализации белков WSCP-I и DUF538 скудны и противоречивы. Биоинформатическими методами предсказано вероятное наличие в составе белка CaWSCP последовательности, сигнализирующей о транспорте белка в хлоропласты [Gholizadeh, 2016], однако экспериментально присутствие его там показано не было, а для гомологов этого белка в группе DUF538 предсказана, напротив, локализация вне хлоропластов [Gholizadeh, 2016].

Таким образом, группа DUF538 может представлять собой группу стресс-индуцируемых гидролаз различной локализации, расщепляющих сложноэфирные связи и ускоряющих в том числе процессы катаболизма Хл в подверженных стрессу растениях. CaWSCP, в свою очередь, гипотетически может выполнять роль стресс-индуцируемого утилизатора/переработчика Хл в вещества с антиоксидантными свойствами. При этом функции всех белков DUF538 сложно увязать именно со связыванием Хл и его катаболизмом из-за того, что не во всех ближайших для WSCP-I гомологах обнаружена способность к его связыванию. Так, белок At5g01610 из *Arabidopsis thaliana*, наиболее похожий на CaWSCP по аминокислотной последовательности среди других белков семейства DUF538, не был ранее описан как способный связывать Хл, а важные для связывания Хл остатки Cys-2 и Cys-30 или их аналоги в нём отсутствуют [Takahashi, Seki et al., 2014].

Отдельного упоминания заслуживают результаты опытов по совместной инкубации CaWSCP и BoWSCP, которые выявили факт ингибирования хлорофиллазной активности CaWSCP эквимолярным количеством BoWSCP [Gholizadeh, 2017]. Полученные результаты позволяют сделать предположение о возможности совместной работы данных белков в качестве пары фермент-ингибитор, однако для дальнейшего развития этой идеи нужно сначала найти растительные организмы, в которых присутствовали бы белки WSCP обоих классов одновременно.

Белки WSCP-II в функциональном плане изучены более подробно, чем белки WSCP-I. Они отличаются достоверно более низким стехиометрическим соотношением белок/пигмент, чем участвующие в фотосинтезе белки (у белков WSCP-II оно равно единице). Это, а также тот факт, что они локализованы в эндоплазматическом ретикулуле, делает маловероятным их участие в процессе фотосинтеза [Horigome et al., 2007].

Прежде всего, с точки зрения функциональной роли белков WSCP-II в растениях важен тот факт, что эти белки филогенетически относятся к семейству ингибиторов протеиназ Кунитц-типа [Nishio et al., 1997; Shinashi et al., 2000; Satoh et al., 2001]. В функциональном плане эта связь не проявляется отчётливо, так как проверка способности белков WSCP-II ингибировать протеазы привела к неоднозначным, хаотичным результатам. Белки из *Brassica oleracea* var. *gemmifera* [Kamimura et al., 1997], *Brassica oleracea* var. *botrytis* [Nishio et al., 1997] *Arabidopsis thaliana* [Boex-Fontvieille et al., 2016] и *Brassica napus* [Bouargalne et al., 2023] в опытах *in vitro* не проявляли способности ингибировать такие сериновые протеазы, как трипсин и химотрипсин. Одновременно с этим белок WSCP-II из *Arabidopsis thaliana* ингибировал цистеиновую протеазу папаин [Boex-Fontvieille et al., 2016]. Опыты *in vitro* показывают, что белок BnD22 (WSCP из *Brassica napus*) является мощным ингибитором цистеиновых протеаз [Bouargalne et al., 2023], но проявляет лишь слабое ингибирующее воздействие на активность эндогенных протеаз листьев и совсем не ингибирует трипсин, субтилизин и протеиназу К [Ilami et al., 1997]. В частичное противоречие с этими данными *in vitro* опытов входят результаты опытов *in vivo*, в которых наблюдали чёткую отрицательную корреляцию между наличием в листьях белка BnD22 и протеолитической активностью в них [Ilami et al., 1997].

Отдельного внимания с точки зрения исследования протеиназ-ингибирующей активности белков WSCP-II заслуживает белок AtWSCP из *Arabidopsis thaliana*. Данный белок может быть обнаружен в перегородке гинецея, в прорастающих стручках (до 0,1% от общего белка) и в цветках растения [Bektas et al., 2012]. В дальнейшем было обнаружено, что AtWSCP обильно накапливается в апикальном крючке (“apical hook”) этиолированных растений и его экспрессия снижается в процессе регулируемого светом озеленения проростка. В клетках данный белок был обнаружен (с помощью флуоресцентной метки) в области клеточной стенки, апопласта и вакуолей [Boex-Fontvieille et al., 2015]. В апикальном крючке AtWSCP взаимодействует с цистеиновой протеиназой RD21 (Responsive To Desiccation 21), которая, согласно данным литературы, играет одну из центральных ролей в иммунитете растений против патогенов и является мишенью для многих эффекторных молекул, выделяемых патогенами [Huang et al., 2025]. Так, например, белок, синтезируемый *Magnaporthe oryzae*, ингибирует гомологичную протеиназу OsRD21 риса и, в связи с этим, обладает конвергентным структурным сходством с белками WSCP-II [Liu et al., 2024]. Согласно описанному механизму, AtWSCP обратимо

ингибирует RD21 до момента выхода ростка на свет. После выхода ростков на свет и начала фотоморфогенеза AtWSCP связывает хлорофиллиды и теряет способность ингибировать RD21, поскольку протеаз-ингибирующий сайт расположен рядом с сайтом связывания Хл. Также в этот момент прекращается синтез AtWSCP, но вместо него начинается синтез белка Serpin1, который, в отличие от AtWSCP, осуществляет уже необратимое ингибирование протеазы RD21. Такое гибкое и многоуровневое ингибирование является важным для растений, поскольку протеаза RD21 не только контролирует клеточную гибель растительных клеток [Rustgi et al., 2017], но и защищает растение от поедания. Протеаза RD21, активируемая после выхода ростка на свет, в опытах *in vivo* достоверно защищает апикальный крюк от поедания мокрицами [Boex-Fontvieille et al., 2015]. Синтез белка AtWSCP положительно регулируется транскрипционным фактором HEC1 и отрицательно - NTT, участвующими в развитии цветков, а также усиливается этиленом, выделяемым растениями при раневых повреждениях. Согласно результатам опытов по кормлению мокриц белком AtWSCP, данный белок может ингибировать протеиназы членистоногих [Boex-Fontvieille et al., 2016].

Автор хочет отдельно отметить, что протеиназ-ингибирующая активность и Хл-связывающая активность у белков WSCP могут быть не взаимоисключающими, как показано на примере белка AtWSCP. Так, ингибирующая активность белка BnD22 к папаину не уменьшалась, а возрастала при связывании белком Хл. При этом фотоустойчивость комплекса папаин-BnD22-Хл была ниже, чем у свободного комплекса [Bouargal et al., 2023].

Вторым фактором (помимо филогенетической принадлежности), определяющим возможную функциональную роль белков WSCP-II, является то, что индукция синтеза и накопление многих белков WSCP-II так или иначе связаны с ответом растительного организма на стрессорные воздействия или же приурочены к реализации тех или иных процессов онтогенеза. Проявление этой связи носит весьма разнообразный характер. Так, хоть белок WSCP-II и образуется во всех тканях растения *Lepidium virginicum*, наибольшее его количество было обнаружено именно в развивающихся частях растения, которые, очевидно, обладают большей чувствительностью к повреждениям [Takahashi, Yanai et al., 2013]. В опытах *in vivo* было показано, что накопление белка WSCP-II в растениях *Raphanus sativus* происходит при возникновении солевого стресса или засухи [Lopez et al., 1994]. В растениях *Brassica oleracea* var. *botrytis* белок WSCP-II синтезировался в ответ на отделение листьев [Nishio et al., 1997], а в растениях *Brassica oleracea* var. *capitata* белок WSCP синтезировался при тепловом стрессе [Annamalai et al., 1999]. Белок BnD22 не был обнаружен в растениях рапса (*Brassica napus*), культивируемых при достаточном поливе, но составлял более 1% от общего содержания белка в листьях растений, выросших в условиях засухи; при регидратации этот белок постепенно исчезал из организма [Pami et al., 1997]. Синтез белка BnD22 также индуцировали азотное голодание или

обработка метилжасмонатом - стрессовым гормоном, модулирующим защитные реакции растений. В последнем случае наблюдалось накопление BnD22 вплоть до доли в 9% от всех растворённых белков [Desclos et al., 2008]. Основываясь на этих данных, авторы исследования предполагали, что в условиях дефицита азота и других неблагоприятных условиях индукция BnD22 в молодых листьях масличного рапса может сохранять целостность фотосинтетических ферментов путем ингибирования протеаз, что важно для поддержания метаболической активности и роста [Desclos et al., 2008].

Опыты с трансгенными растениями, в которых были гиперэкспрессированы белки WSCP-II, показали отчасти согласующиеся результаты, указывающие на повышение устойчивости растений к стрессам. Так, гиперэкспрессия белка WSCP из *Brassica oleracea* var. *botrytis* приводила к повышенному содержанию молекул-предшественников Хл в семидневных этиолированных проростках трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*), не обладающих собственным белком WSCP, но не влияла на процессы катаболизма Хл в них *in vivo* [Damaraju et al., 2011]. Общее количество пигментов ксантофиллового цикла (виолаксантин, зеаксантин и антероксантин) в растениях с гиперэкспрессией WSCP было выше, чем в растениях дикого типа, но степень окисления молекул из данного пула была ниже. Существенно, что растения с гиперэкспрессией белков WSCP-II несколько лучше противостояли длительному световому стрессу, проявляли меньшую пероксидазную активность и были менее подвержены окислительному стрессу, чем растения дикого типа [Damaraju et al., 2011]. Гиперэкспрессия белка «WSCP1» из *Brassica napus* (класс II) в растениях *Arabidopsis thaliana* быстро стареющей линии RIL232, приводила к замедлению процессов деградации Хл (примерно на 20%), подавлению активности сериновых протеиназ и, в итоге, к задержке индуцированного темнотой старения листьев [James et al., 2025].

Также обнаружена связь белков WSCP-II с накоплением или, наоборот, отсутствием определенных ионов металлов в растениях. Так, *Arabidopsis thaliana* с мутацией по белку WSCP аккумулирует кадмий, марганец и цинк, а в «бескадмиевых» сортах растения ген WSCP гиперэкспрессирован [An et al., 2023]. В *Brassica napus* наблюдали гиперэкспрессию белка WSCP при обработке растения биогенными цинковыми наночастицами [Sawati et al., 2022].

Третьим фактором (помимо филогенетической принадлежности и стресс-индуцируемого характера синтеза белков), определяющим возможную функциональную роль белков WSCP-II, является их внутриклеточная локализация. С помощью флуоресцентных меток было показано, что белок BogWSCP (из *Brassica oleracea* var. *gemmifera*) и белок LvWSCP (из *Lepidium virginicum*) в клетке накапливаются в эндоплазматических тельцах («ER-bodies») [Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013]. Внутриклеточная локализация в эндоплазматических тельцах также показана для белков RshWSCP (из *Raphanus sativus* var. *raphanistroides*) и AtWSCP (из

Arabidopsis thaliana) [Takahashi, Aizawa et al., 2015]. В функциональном плане эндоплазматические тельца являются уникальными структурами растений группы *Brassicaceae*, важными для защиты растения от вредителей и патогенных грибов, так как они содержат множество β -глюкозидаз, липазоподобных белков и лектинов, препятствующих развитию этих патогенов [Yamada et al., 2011, Takahashi et al., 2012]. Эти внутриклеточные структуры можно подразделить на два типа: эндоплазматические тельца проростков и корней и эндоплазматические тельца, индуцируемые раневым повреждением. Первые встречаются в эпидермисе и семядолях и их синтез *de novo* происходит после прорастания семян. Синтез эндоплазматических тел второго типа индуцируется метилжасмонатом и служит частью механизмов обеспечения устойчивости растения к насекомым или патогенам. Содержащиеся в эндоплазматических тельцах белки необходимы для образования токсичных соединений, которые обеспечивают защиту растений от насекомых или грибов. Особо стоит отметить, что субстрат для данных белков часто запасается в отдельных вакуолях, и не контактирует с этими ферментами до момента физического разрушения клетки [Yamada et al., 2011]. Эндоплазматические тельца в избытке присутствуют в проростках и корнях, контактирующих с почвой; в этих тканях они могут служить решающим фактором в формировании устойчивости к различным почвенным грибам [Yamada et al., 2011].

В течение нескольких десятилетий, по мере накопления и осмысления информации о белках WSCP-II в литературных источниках, предположения о физиологической роли данной группы белков постоянно изменялись и модифицировались. Так, изначально предполагалось, что белки WSCP-II могут быть белками-транспортёрами Хл [Satoh et al., 1998]. Как известно, стареющие хлоропласты выделяют липоидные пузырьки, содержащие Хл, которые могут представлять собой компоненты хлоропластов, находящиеся в процессе деградации в цитоплазме или вакуолях. При другом пути деградации хлоропластов происходит одновременное удаление хлоропластов целиком, как при фагоцитозе [Satoh et al., 1998]. При деградации по обоим этим путям Хл должен катаболизироваться в цитозоле или вакуолях, где гипотетически мог происходить контакт его молекул с белками WSCP-II [Satoh et al., 1998]. В настоящее время предполагаемая функция белков WSCP-II как участников процессов утилизации Хл в клетке представляется маловероятной.

В начале 2010-х годов, после осмысления всей новой информации о защитной роли эндоплазматических телец, локализации в них белков WSCP-II и пониженной (как тогда считалось) скорости генерации холобелками WSCP-II $^1\text{O}_2$ (по сравнению со свободным Хл), в литературе начало преобладать предположение о фотозащитной функции белков WSCP-II. Считалось, что апобелки WSCP-II, в случае повреждения и высвобождения в единую среду содержимого хлоропластов и эндоплазматических телец, связывают свободный Хл, находящийся

в поврежденных тилакоидных мембранах, и таким образом подавляют образование АФК [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012]. В настоящее время эта гипотеза входит в противоречие с новыми данными, согласно которым Хл, связанный в составе холобелков WSCP, сам служит активным генератором $^1\text{O}_2$ [Agostini et al., 2017].

Отдельного обсуждения заслуживает работа, в результате которой было обнаружено, что белок проростков ячменя (*Hordeum vulgare*), имеющий сходную с белками WSCP N-концевую последовательность (в статье он назван FCBP – “Free Chlorophyll(ide) Binding Protein”), накапливается в этиолированных проростках, подвергнутых воздействию света в течение 2 часов [Reinbothe et al., 2004]. В данных условиях предшественник данного белка массой 27 кДа транспортировался в этиолированные хлоропласты, причём этот процесс зависел от света и индуцировался в присутствии предшественника тетрапиррола – 5-аминолевулиновой кислоты. Интересным дополнением к результатам этого исследования служит тот факт, что молекулы-предшественники FCBP накапливаются на внешней оболочке развивающихся этиохлоропластов ячменя *in vivo* и импортируются в пластиды только в условиях, когда происходит образование хлорофиллида *b*. Таким образом, FCBP может оказаться не только первым белком WSCP-II, потенциально обнаруженным в не принадлежащем к семейству *Brassicaceae* организме, но также и первым идентифицированным переносчиком хлорофиллида в растении ячменя, функция которого реализуется при деэтиоляции проростков [Reinbothe et al., 2004]. К сожалению, известна только N-концевая последовательность данного белка, включая мотив «светособирающего Хл *a/b*-связывающего белка» ((F/Y)DPLGL) [Reinbothe et al., 2004], но его полная структура не представлена.

Суммируя вышесказанное, сложно приписать белкам WSCP-II какую-либо одну определенную функцию. Возможно, белки этого семейства могут выполнять параллельно несколько функций в зависимости от конкретно обсуждаемого представителя этой группы. Так, данные белки могут быть стресс-индуцируемыми ингибиторами различных растительных протеиназ (регуляторных и катаболизирующих белки внутри живой клетки), протеиназ насекомых-фитофагов или даже хлорофиллаз-подобных ферментов. Также данные белки могут связывать Хл в регуляторных целях (как это делает AtWSCP).

Такая многофункциональность белков WSCP-II может быть объяснена универсальностью их третичной структуры. Семейство ингибиторов протеиназ Кунитц-типа принадлежит к надсемейству белков с укладкой «бета-трилистник», которое демонстрирует чрезвычайно высокую вариабельность в плане взаимодействий с молекулами-мишенями: у белков с таким типом укладки наблюдали способности в распознавании белков, ДНК, углеводов, и даже ферментативную активность [Azarkan et al., 2011]. В качестве примеров белков с подобной укладкой (кроме ингибиторов протеиназ Кунитц-типа) можно привести цитокины, агглютинины,

рицин В-подобные лектины, факторы роста фибробластов, интерлейкины, столбнячные и ботулинические нейротоксины [Azarkan et al., 2011]. Высокая вариабельность длины, последовательности и укладки многочисленных петель, экспонированных на поверхности белка, а также толерантность к точечным мутациям определяют большое разнообразие мишеней для данных белков и позволяют им связывать даже несколько молекул одновременно. В качестве примера можно привести ингибитор протеиназ из папайи (PPI), который может ингибировать одновременно две молекулы трипсина [Azarkan et al., 2011]. При этом, поскольку нативное состояние в энергетическом ландшафте белков надсемейства «трилистника» доступно несколькими путями, фолдинг этих белков возможен даже в случае блокировки наиболее подходящего пути сворачивания точечными мутациями [Azarkan et al., 2011].

1.2.7. Возможное практическое использование белков WSCP

Спектральные и фотохимические свойства антенных систем и реакционных центров определяются взаимодействиями «пигмент-пигмент» и «пигмент-белок», детальное исследование которых является необходимым условием для понимания механизмов, лежащих в основе функционирования фотосинтетического аппарата. Однако исследование данных взаимодействий на комплексах фотосинтетического аппарата осложнено тем, что все они сложно устроены и содержат множество различных пигментов. Поэтому белки WSCP-II с одним или двумя видами молекул Хл и однообразным белковым окружением представляют собой почти идеальную модельную систему для исследований как пигмент-пигментных, так и пигмент-белковых взаимодействий [Renger et al., 2011]. В настоящее время известно много работ, исследующих данные белки как модельную систему для фотофизических исследований [Theiss et al., 2007; Schmitt et al., 2008; Renger et al., 2011; Rusevich et al., 2015; Adolphs et al., 2016; Adolphs et al., 2018; Agostini, Palm et al., 2018; Agostini et al., 2020; Fresch et al., 2020; Götze, Pi et al., 2021; Caycedo-Soler et al., 2022; Ciuti et al., 2022; Friedl et al., 2022; Mai et al., 2024; Seibt et al., 2023; Riedl et al., 2024; Hajizadeh et al., 2025]. Есть даже работа, рассматривающая белок WSCP-II как модель для квантовых вычислений, где возбуждения отдельных пигментов соответствует кубитам в квантовой информатике [Ringys, 2021].

Помимо использования в качестве модельного объекта исследований, WSCP-II имеет перспективы использования в биотехнологии в качестве фотосенсибилизатора [Dodge et al., 2020]. Используя свежие данные о способности белков WSCP-II генерировать $^1\text{O}_2$ в значительных количествах, ученые успешно пробовали использовать белки WSCP вместе с аскорбатом и кислородом как генератор перекиси водорода для литических полисахаридмонооксигеназ (LPMO) и опосредуемой ими деполимеризации целлюлозы [Dodge et al., 2020]. По этой причине

белки WSCP можно рассматривать как перспективные объекты для использования в сфере биокатализа [Dodge et al., 2020].

Белки WSCP-II имеют потенциал использования в медицине. Так, белок LvWSCP исследовали на возможность быть контрастирующим агентом для спектроскопической фотоакустической визуализации опухолей [Tsang et al., 2025]. Более того, этот же белок исследовали на возможность быть средством фотодинамической терапии [Liang et al., 2025]. Имеется также работа, в которой холобелки WSCP сорбировали на перспективных для фотодинамической терапии матрицах из кремниевых наночастиц, однако данная сорбция приводила к потере стабильности пигмент-белкового комплекса [Zatta et al., 2024].

Ещё одним потенциальным направлением использования белков WSCP-II является создание искусственных «безмембранных органелл» («membraneless organelles», MLOs) [Li, Park et al., 2022]. В частности, холобелками WSCP-II декорировались искусственные немембранные (с разделением фаз белка в клетке) органеллы, которые были созданы из химерного белка, составленного путём объединения богатого тирозином домена Mfp-3 («белка ноги мидии – 3») и доменов с повторами аргинин-глицин-глицин (RGG). В полученной системе комплексы WSCP-II играли роль фоторегулятора: в нужный момент (под воздействием регулирующего света) они продуцировали $^1\text{O}_2$, который, в свою очередь, вызывал «дубление» наружного слоя органеллы, делая его непроницаемым для молекул из окружающего раствора. Таким образом исследователи «отключали» внутреннее содержимое органеллы, перекрывая доступ субстрата к ферментам (в публикации – к каспазе-3) внутри неё [Li, Park et al., 2022].

Что касается белков WSCP-I, то сведения о попытках их практического использования почти не встречаются в литературе. Можно лишь отметить, что белок CaWSCP, принадлежащий к классу I, наравне с белками WSCP-II исследуется как основа для создания контрастирующих агентов для спектроскопической фотоакустической визуализации опухолей [Kim et al., 2025].

1.3. Состояние исследований белков WSCP и тематики данной диссертационной работы

Представленный обзор литературы свидетельствует о том, что семейство белков WSCP включает в себя две неродственные группы, которые изучены в разной степени касательно их возможных функций, строения и участия в фотохимических реакциях.

Белки WSCP-I, несущие домен DUF538, обладают нерасшифрованной на данный момент трёхмерной структурой и практически не исследованы в аспекте функциональной роли в растениях. В то же время подробно изучены такие свойства белков этой группы как фотоконверсия и способность фотохимически взаимодействовать с донорами и акцепторами электрона.

Что же касается белков WSCP-II, несущих домен ингибиторов протеиназ Кунитц-типа, то эти белки изучены намного более подробно, чем белки WSCP-I. Подробно изучена их структура и возможный спектр выполняемых ими функций в растениях, однако их фотохимические свойства практически не изучены. Достоверно установлено, что в состав их холобелков входит димер Хл, который структурно сходен со «специальной парой» реакционного центра фотосистем, однако, сведения о фотохимической активности пигментов внутри WSCP отсутствуют. Данная работа представляет собой попытку заполнить данный пробел в знаниях.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Обоснование выбора биологических объектов исследования

Выбор наиболее подходящих для нашего исследования организмов – источников белков WSCP-II осуществляли, используя базу данных UniProt со встроенным алгоритмом поиска BLAST. Для детального сравнения из этой базы данных были взяты белковые последовательности, перечисленные в таблице 1.

Таблица 1. Список использованных для биоинформатического исследования аминокислотных последовательностей белков.

Название последовательности в базе данных UniProt:	Код последовательности в базе данных UniProt:
WSCP-IIВ из <i>Lepidium virginicum</i>	O04797
WSCP-IIВ из <i>Brassica rapa</i> var. <i>oleifera</i>	A0A1Q2TD47
WSCP-IIВ из <i>Sinapis arvensis</i>	A0A1Q2TD46
WSCP-IIВ из <i>Brassica juncea</i> var. <i>crispifolia</i>	A0A1Q2TD53
Drought-induced 22kDa protein (Фрагмент) из <i>Raphanus sativus</i>	Q41170
Kunitz-type trypsin inhibitor-like 1 protein из <i>Noccaea caerulescens</i>	A0A1J3H3W6
WSCP-IIА (Фрагмент) из <i>Brassica nigra</i>	A0A193PMF8
Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (Фрагмент) из <i>Noccaea caerulescens</i>	A0A1J3GVL5
WSCP-IIА из <i>Raphanus sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>	K0IPI1
WSCP-IIА из <i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i>	Q8W5R3
WSCP-IIА (Фрагмент) из <i>Brassica oleracea</i> var. <i>viridis</i>	Q8H0E9
WSCP-IIА из <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Q7GDB3
Heat stress-induced protein из <i>Brassica oleracea</i>	O82795
WSCP-IIА (Фрагмент) из <i>Brassica oleracea</i> var. <i>viridis</i>	Q8H0F0
WSCP-IIА из <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	I2FI78
WSCP-IIА из <i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9C7S6
BnD22 drought induced protein из <i>Brassica napus</i>	Q43395
Bark lectin isoform 2 из <i>Noccaea caerulescens</i>	A0A1J3J2Z4
WSCP-IIА из <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Q8H0E7
Miraculin-like protein из <i>Nicotiana tabacum</i>	A0A1S3XC37
Kunitz-type serine protease inhibitor DrTI из <i>Delonix regia</i>	P83667

Для биоинформатического множественного выравнивания выбранных аминокислотных последовательностей использовали веб-сайт европейского института биоинформатики со встроенным сервисом множественного выравнивания «Clustal Omega» (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) [Madeira et al., 2024]. На основе полученного множественного выравнивания построили филогенетическое дерево с использованием программы MEGA7 (Maximum likelihood tree, Model - Jones-Taylor-Thornton (JTT); Bootstrap-анализ - 300 реплик).

2.2. Векторы для трансформации клеток *Escherichia coli*

При трансформации бактерий *Escherichia coli* (далее – *E. coli*) использовали векторы для бактериальной экспрессии pet24b+ с уже встроенными нуклеотидными последовательностями, кодирующими белки WSCP-II из растений *Brassica oleracea* var. *botrytis* и *Lepidium virginicum* (далее обозначенные как BoWSCP и LvWSCP соответственно). Данные векторы нам любезно предоставили Dr. Hiroyuki Satoh (Department of Biomolecular Science, Toho University, Japan), а также Dr. Mara Werwie и Prof. Dr. Harald Paulsen (Institute of Molecular Physiology, The Johannes Gutenberg University Mainz, Germany).

Вектор pet24b+ содержал ген резистентности к канамицину, ген lac-репрессора, а также сайт для встройки последовательности для транскрипции, содержащий на конце шесть закодированных остатков гистидина (для возможности очистки рекомбинантного белка методом аффинной хроматографии с Ni-агарозой). В данный сайт уже были встроены нуклеотидные последовательности, кодирующие белки BoWSCP (540 п.н.) либо LvWSCP (546 п.н.), в результате чего векторы имели следующие размеры: 5771 п.н. у pet24b-BoWSCP и 5777 п.н. у pet24b-LvWSCP.

2.3. Общий план и последовательность операций для получения штаммов *E. coli*, экспрессирующих белки BoWSCP и LvWSCP

Изначально плазмидная ДНК векторов pet24b-BoWSCP и pet24b-LvWSCP была получена в количестве, достаточном для трансформации клеток штаммов *E. coli*, но недостаточном для контроля структурной целостности векторов и проверки их на наличие мутаций методами рестрикционного анализа и секвенирования.

Для того, чтобы увеличить массу препаратов ДНК векторов, содержащих гены белков BoWSCP и LvWSCP, до количества, достаточного как для осуществления контрольных исследований, так и для трансформации клеток экспрессионных штаммов *E. coli*, мы производили предварительную трансформацию имеющимися векторами клеток *E. coli* штамма XL1-Blue, который широко используются в молекулярном клонировании плазмидной ДНК и для

выделения плазмид [Брюханов и др., 2012]. В дальнейшем из ночных культур данных штаммов (XL1-Blue-pet24b-BoWSCP и XL1-Blue-pet24b-LvWSCP) выделяли препарат плазмидной ДНК, одну часть которого исследовали для контроля целостности вектора и отсутствия в нём мутаций, а оставшуюся часть оставляли для последующей трансформации клеток *E. coli* экспрессионного штамма в случае положительных результатов вышеописанных контрольных исследований. Контроль присутствия в выделенных нами препаратах векторов pet24b-BoWSCP и pet24b-LvWSCP вставок генов BoWSCP или LvWSCP корректного размера проводили, подвергая препараты вектора рестрикционному анализу с последующим измерением длин рестрикционных фрагментов методом электрофореза в агарозном геле. Проверку на отсутствие мутаций в гене экспрессируемого белка осуществляли путём секвенирования препаратов векторов в компании «Evrogen».

Для получения препаратов белков BoWSCP и LvWSCP производили трансформацию клеток *E. coli* штамма BL21DE3. В данном штамме содержится ген T7 РНК-полимеразы под контролем *lac*-UV5 промотора (индуктором которого является IPTG) а также отсутствуют протеазы, расщепляющие рекомбинантные белки [Брюханов и др., 2012]. Состав протеома культур полученных штаммов анализировали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ как до, так и после индукции синтеза белка в клетках с помощью IPTG.

Исходные штаммы *E. coli* XL1-Blue и BL21DE3 были любезно предоставлены доцентом кафедры молекулярной биологии Биологического факультета МГУ, к.б.н. О.И. Карповой. Коллекцию штаммов поддерживали путём регулярных пересевов на новые чашки с агаризованной средой LB (0,5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% NaCl, 2% агара).

2.4. Трансформация компетентных клеток штаммов *E. coli*

Трансформацию штаммов *E. coli* осуществляли химическим методом. Для получения компетентных клеток использовали реактивы набора «TransformAid Bacterial Transformation Kit» (от Thermo Scientific™).

Суспензию осадка компетентных клеток, свежеприготовленных согласно инструкции, отбирали двумя аликвотами по 50 мкл в стерильные пластиковые пробирки с аликвотами препарата плазмиды, после чего смесь клеток и плазмидной ДНК перемешивали на вихревом смесителе и инкубировали на льду 5 минут. После данной инкубации суспензии клеток распределяли по поверхности чашки Петри с агаризованной средой LB и канамицином (50 мкг×мл⁻¹). Далее чашки помещали в термостат при 37 °С для роста в течение 12-18 часов. Для негативного контроля аликвоту компетентных клеток, к которой не добавляли аликвоты препарата плазмиды, распределяли по чашке Петри с содержащей канамицин агаризованной средой LB и также помещали в термостат на 37 °С для роста в течение ночи.

Коллекцию штаммов поддерживали путём регулярных пересевов на чашки Петри со свежей средой аналогичного состава.

2.5. Выделение плазмидной ДНК из культур трансформированных штаммов *E. coli* XL1-Blue

Для получения плазмидной ДНК из культур депозитных штаммов XL1-Blue-pet24b-BoWSCP и XL1-Blue-pet24b-LvWSCP использовали готовый набор «Plasmid Miniprep» производства компании «EvoGen».

2.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили согласно пособию «Молекулярная микробиология» [Брюханов и др., 2012] с модификациями. Состав геля - 1% агарозы в TAE-буфере (1 mM ЭДТА, 20 mM уксусной кислоты, 40 mM Трис (pH 7,6)). Камеру для электрофореза заполняли также TAE-буфером. Постоянное напряжение до входа проб в гель – 30 Вольт, после входа проб в гель – 160 Вольт.

В качестве стандарта молекулярных масс использовали продукт фирмы Thermo Scientific «GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use #SM0313». После окончания электрофореза гель погружали на 15 минут в раствор бромистого этидия с концентрацией 3 мкг/мл для окрашивания ДНК. После данной инкубации гель промывали до 5 раз водой и помещали на трансиллюминатор для гельдокументирования с помощью цифровой камеры.

2.7. Проверка плазмид на наличие вставок нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки BoWSCP и LvWSCP

Проверку плазмид на наличие вставок целевых белков и на отсутствие в них мутаций осуществляли методами рестрикционного анализа и секвенирования. Для рестрикционного анализа к препаратам плазмиды, очищенным с помощью готового набора «Plasmid Miniprep», добавляли буфер «Tango» и рестриктазы XhoI и BglII активностью 5 U каждая. Затем образцы инкубировали 4 часа при 37 °C. Результаты рестрикции анализировали методом электрофореза в агарозном геле и сравнивали с результатами рестрикции, смоделированными на основе известной последовательности вектора с помощью интернет-сервиса «Restriction analyzer» (<https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>). Полученные данные свидетельствовали о корректности значений молекулярных масс нуклеотидных последовательностей как самих векторов pet24b+, так и содержащихся в них вставок генов белков BoWSCP или LvWSCP.

Секвенирование проводили в коммерческой компании «EvoGen» с использованием прямого и обратного праймеров T7 (T7dir; T7rev). Результаты секвенирования указывали на

отсутствие мутаций в нуклеотидных последовательностях, кодирующих белки BoWSCP и LvWSCP.

2.8. Получение и очистка препаратов целевых белков семейства WSCP

Индукцию синтеза препаративных количеств белка проводили согласно пособию «Молекулярная микробиология» [Брюханов и др., 2012] с модификациями.

Для проведения индукции синтеза белка выращивали культуру клеток *E. coli* штамма BL21DE3 с необходимой плазмидой в 10 мл жидкой среды LB (0,5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% NaCl) с канамицином 50 мкг×мл⁻¹ на качалке при 37 °С и 200 об/мин в течение 12-18 часов. Выросшую культуру переносили в колбу с аналогичной жидкой средой LB и канамицином в соотношении 1:100 (3 мл культуры на 300 мл стерильной среды), после чего колбы инкубировали 2 часа на качалке при 37 °С и 200 об/мин.

После инкубации из культуры отбирали аликвоту в 1 мл для контроля процесса индукции методом денатурирующего электрофореза в ПААГ, а к оставшейся культуре добавляли раствор IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После добавления данного индуктора культуру инкубировали с перемешиванием на качалке 200 об/мин при заданной температуре (37 °С или 22 °С) от 4 часов до суток. После завершения инкубации и отбора ещё одной аликвоты для контроля индукции методом денатурирующего электрофореза в ПААГ оставшуюся культуру осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3990g, образовавшийся осадок клеток замораживали при -20 °С для последующего выделения белка.

В ходе выделения белка клетки бактерий *E. coli*, содержащие белки BoWSCP или LvWSCP, ресуспендировали в 20 мМ буфере Трис-НCl (pH 8,0) и разрушали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Digital Sonifier Model 450 102C (производство США), после чего суспензию центрифугировали 15 минут при 10000g и 4 °С с отбором супернатанта в отдельную емкость.

Полученный супернатант лизата клеток использовали либо для очистки апобелка методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе, либо для сборки Хл-белковых комплексов непосредственно в лизате с использованием осадка тилакоидов.

В случае получения готовых Хл-белковых комплексов выделение осадка тилакоидов производили одним из двух способов в зависимости от количества используемой массы листьев:

- 1) С растиранием листьев в фарфоровой ступке. Необходимую массу фрагментов листьев шпината помещали в фарфоровую ступку, наполненную 20 мМ Трис-НCl (pH 8,0) в объеме 5 мл на каждый грамм листьев. Фрагменты листьев осторожно придавливали до позеленения раствора и потемнения пластинок листьев, а затем буфер сливали. После этого в ступу добавляли

аналогичный исходному объем 20 мМ Трис-НCl (рН 8,0) и растирали листья до кашеобразной консистенции.

2) С измельчением с помощью бытового блендера. Необходимую массу фрагментов листьев шпината промывали три раза дистиллированной водой. Далее к листьям добавляли 20 мМ Трис-НCl (рН 8,0) в объеме 50 мл на каждые 20 г листьев, после чего в условиях холодной комнаты смесь листьев с буфером перемалывали бытовым погружным блендером до полной гомогенизации смеси. Затем гомогенат листьев шпината отфильтровывали через сито с диаметром ячеек 1 мм.

Полученный одним из двух вышеперечисленных способов растительный гомогенат центрифугировали при 400g и +4 °C в течение 5 минут для осаждения крупных обломков клеток. После этого супернатант снова центрифугировали 15 минут при 4000g и +4 °C для получения осадка тилакоидов. Супернатанты после данного центрифугирования выбрасывали, а осадки тилакоидов ресуспендировали в 20 мМ Трис-НCl (рН 8,0) в суммарном объеме до 40 мл, после чего повторно центрифугировали 15 минут при 4000g и +4 °C. Зеленый супернатант отбрасывали, оставляя единый осадок тилакоидов со всей массы листьев.

С целью расчёта будущего количества смешиваемых компонентов измеряли количество Хл в осадке тилакоидов. Для этого осадок тилакоидов ресуспендировали в 20 мМ растворе Трис-НCl (рН 8,0) объемом от 10 до 40 мл и из полученной суспензии отбирали две аликвоты по 50 мкл. Аликвоты смешивали с 350 мкл Трис-НCl 20 мМ (рН 8,0) и 1600 мкл ацетона, после чего смеси перемешивали на вихревом смесителе и центрифугировали при 12100g в течение 5 минут при комнатной температуре. Полученный супернатант объединяли в одну емкость и на спектрофотометре измеряли его оптическую плотность при 663 и 647 нм с использованием в качестве контрольной пробы смеси «80% ацетон + 20% Трис-НCl 20 мМ (рН 8,0)». Результаты измерений (с учётом осуществленных разбавлений) использовали для расчёта содержания Хл *a* и Хл *b* в исходной суспензии осадка тилакоидов по специальной формуле для смеси «ацетон + 20% воды» [Lichtenthaler, Buschmann, 2001]: $[Хл_a] \text{ (мкг} \times \text{мл}^{-1}) = 12,25 \times OD_{663} - 2,79 \times OD_{647}$; $[Хл_b] \text{ (мкг} \times \text{мл}^{-1}) = 21,50 \times OD_{647} - 5,10 \times OD_{663}$.

Исходя из полученных значений количества Хл *a* и Хл *b* в осадке тилакоидов, а также из измеренного количества апобелка WSCP в очищенном препарате и ожидаемого количества апобелка в неочищенном клеточном лизате, смешивали суспензию тилакоидов с раствором апобелка или содержащим его лизатом клеток. Смешивание проводили в соотношении, необходимом для достижения молярного соотношения «Хл *a* / апобелок BoWSCP» и «Хл *a+b* / апобелок LvWSCP» не менее чем 15:1. После перемешивания на вихревом смесителе смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение часа для формирования Хл-белковых комплексов. Затем полученный препарат с целью очистки от тилакоидов либо

центрифугировали в использованной для инкубации пробирке при 10000g 15 минут, либо разделяли по пластиковым пробиркам объемом до 2 мл и центрифугировали при 12100g 15 минут. Полученный супернатант отбирали в отдельные пластиковые пробирки, после чего в качестве дополнительного этапа очистки проводили его термическую обработку на термостате «Термит» при +99 °C 10 минут. Прогретые препараты центрифугировали 5 минут при комнатной температуре 12100g с последующим отбором супернатанта, а осадок денатурировавшего белка выбрасывали.

Дальнейшую очистку полученных препаратов методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-агарозой проводили согласно [Charlton, Zachariou, 2008] с модификациями, путём последовательной промывки колонки со связанным апо- или холобелком WSCP растворами, содержащими 10 mM и 50 mM имидазола. Полную элюцию осуществляли раствором, содержащим 200-300 mM имидазола. Полученные на колонке фракции очистки проверяли методом нативного или денатурирующего (по Лэммли) электрофореза в ПААГ.

Очистку препаратов апобелков и Хл-белковых комплексов от избыточного присутствия соли и имидазола, внесённых в ходе аффинной хроматографии на Ni-агарозе, проводили с помощью диализа. Для диализа использовали диализные трубки «SPECTRA/POR molecular porus membrane tubing 1, M.W. Cut-Off 6000-8000, dry cylinder diameter: 14,6 mm». Трубки подвергали 30 минутному кипячению в растворе 10 mM ЭДТА для удаления возможных следов тяжелых металлов, а затем кипятили два раза по 30 минут в дистиллированной воде. Диализ проводили с использованием магнитной мешалки при +8 °C, сначала 2 часа против 500 мл раствора 10 – 20 mM Трис-HCl (pH 8,0), а затем ночь против 500 мл 10 mM Трис-HCl (pH 8,0). Также при необходимости вместо буфера Трис-HCl (pH 8,0) в качестве противобуфера использовали Na-фосфатный буфер (pH 8,0) аналогичной молярности. После диализа полученные готовые препараты хранили в холодильнике при +4 °C, а для длительного хранения замораживали при – 20 °C.

При необходимости очистки препаратов холобелков WSCP от примеси апобелков, не связавших Хл, применяли центрифугирование препаратов на центрифужных концентраторах с отсечкой молекулярных масс 50 кДа. Фильтрат с не связавшим Хл апобелками отбрасывали, а концентрат холобелков разбавляли повторно буферным раствором.

2.9. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли

Для анализа молекулярной массы белков в препаратах и степени их очистки использовали метод электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли [Laemmli, 1970] с модификациями. Толщина гелей 1,0 мм. Концентрация разделяющего геля варьировала от 10% до 15% акриламида, концентрация концентрирующего геля – 3% акриламида. Камера для

электрофореза - Mini Protean 3 производства компании «Bio-Rad». В качестве электрофорезного буфера использовали Трис-глициновый буфер с SDS (25 мМ Трис, 250 мМ глицина, 0,1% SDS). Для приготовления проб использовали «3× Буфер для проб с SDS» (0,15 М Трис-HCl (pH 6,8); 3% SDS; 30% глицерина; бромфеноловый синий), в который перед использованием добавляли либо β-меркаптоэтанол до концентрации 300 мМ, либо DTT до концентрации 150 мМ. Полученный буфер для проб добавляли к образцам в количестве половины от их объемов. Затем пробы с буфером перемешивали на вихревом смесителе и кипятили 10 минут на водяной бане, после чего или сразу наносили в лунки геля, или хранили в холодильнике при +4 °C и прогревали на твердотельном термостате «Термит» до 60 °C перед внесением. В случае приготовления пробы из осадка клеток, осадок предварительно ресуспендировали в деионизированной воде. В качестве стандарта молекулярных масс использовали коммерческий продукт производства компании Thermo Scientific «PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619, 10 to 250 kDa».

Электрофорез проводили при постоянном напряжении в 80 Вольт до входа проб в разделяющий гель и при 160 Вольт – после входа проб в разделяющий гель. Напряжение подавали до достижения красителем бромфеноловым синим нижней границы геля. После завершения электрофореза разделяющие гели извлекали из стёкол и погружали на 20-30 минут в раствор для фиксации гелей (10% уксусной кислоты, 40% этилового спирта). Затем гель погружали на 20-30 минут в краску для гелей с кумасси (10% уксусной кислоты, 45% этилового спирта, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250). После окраски гель отмывали от не связавшегося с белком красителя 10% раствором уксусной кислоты. Гели сканировали на сканере и хранили при 4-10 °C в растворе 10% уксусной кислоты.

2.10. Нативный электрофорез белков в ПААГ

Процедура нативного электрофореза в ПААГ совпадала по составу реактивов и методике проведения с процедурой денатурирующего электрофореза в ПААГ по Лэммли, описанной ранее, за исключением замены растворов SDS, меркаптоэтанола и DTT на воду и отсутствия стадии кипячения проб.

2.11. Измерение концентрации белка

Концентрацию белка в чистых препаратах белков WSCP измеряли тремя способами: по оптической плотности препаратов при 280 нм, методом Бредфорд, и методом Лоури.

Для оценки количества апобелка WSCP в очищенном и диализованном препарате измеряли его спектр поглощения на приборе «Shimadzu 1601PC» (Shimadzu, Япония) против 10 мМ раствора Трис-HCl (pH 8,0). Количество белка оценивали по оптической плотности

препарата при 280 нм, и при его расчёте использовали коэффициент молярной экстинкции $25440 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [Palm et al., 2017].

Для измерения концентрации белков по методу Бредфорда [Bradford, 1976] использовали либо готовый раствор «Bradford Reagent» производства компании «SIGMA» (B6916-500ml), либо раствор, приготовленный самостоятельно. Во втором случае раствор для метода Бредфорда готовили, растворяя 50 мг Coomassie Brilliant Blue G-250 в 25 мл этилового спирта при перемешивании на магнитной мешалке. К раствору добавляли 50 мл ортофосфорной кислоты и затем доводили объем смеси до 500 мл бидистиллированной водой. Полученный готовый раствор профильтровывали через бумажный фильтр. Калибровочную кривую строили с использованием четырёх препаратов бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией. Измерение оптической плотности проб при 595 нм осуществляли на спектрофотометре «СФ-2000» (ЛОМО, Россия) или «Shimadzu 1601PC» (Shimadzu, Япония).

Для измерения концентрации белка по методу Лоури [Lowry et al., 1951] готовили «раствор А» (0.5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 1% цитрата Na) и «раствор Б» (2% Na_2CO_3 ; 0,4% NaOH). Перед использованием их смешивали в соотношении 1:50, и в итоге получали свежеприготовленный «раствор В». Перед опытом в два раза разбавляли аликвоту готового реактива «Folin & Ciocalteus phenol reagent» (2,0 Normal, «SIGMA»). Спектр поглощения проб в области 600-800 нм измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» (ЛОМО, Россия) или «Shimadzu 1601PC» (Shimadzu, Япония) против контрольной пробы с 10 мМ Трис-НCl (рН 8,0). Калибровочную кривую для перерасчёта значений оптической плотности на концентрацию белка создавали с использованием шести препаратов бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией.

2.12. Исследование спектральных свойств холобелков WSCP и расчёт их пигментного состава

Спектры поглощения образцов при комнатной температуре регистрировали на спектрофотометре «СФ-2000» (ОКБ «Спектр», Россия), а также на спектрофотометрах «Cary 300» («Agilent», США) и «Shimadzu 1601PC» («Shimadzu», Япония) в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН. Для измерения спектров излучения и возбуждения флуоресценции использовали спектрофлуориметр «FluoroMax 4» («Horiba», Япония) в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН, а также спектрофлуориметр «Varian Cary Eclipse» («Agilent», США). Для измерения спектров кругового дихроизма использовали спектрометр кругового дихроизма «Chirascan» («Applied Photophysics», США) в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН.

Пигментный состав полученных нами препаратов холоформ WSCP-II определяли путём представления спектра поглощения холобелков WSCP как суммы спектров поглощения Хл *a* и

Хл *b* в них. Метод базировался на тех фактах, что (1) пик поглощения при 460-470 нм формируется лишь вкладом в поглощение Хл *b*, а (2) коэффициент молярной экстинкции пике 660-680 нм, сформированном полосой поглощения Q_y-перехода, у Хл *a* больше, чем у Хл *b* [Palm et al., 2018]; следовательно, соотношение пика поглощения Хл *b* (460-470 нм) к пику Q_y (660-680 нм) у холоформ WSCP будет неизбежно возрастать при увеличении в них доли Хл *b*.

Для получения спектров монопигментных комплексов BoWSCP- Хл *a*, BoWSCP- Хл *b*, LvWSCP- Хл *a* и LvWSCP- Хл *b* использовали усредненные спектры поглощения Хл *a* и Хл *b* в белках BoWSCP и LvWSCP, оцифрованные из изображений в литературных источниках [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013; Palm et al., 2017; Palm et al., 2018] и затем нормированные на взятые из литературы коэффициенты молярной экстинкции в полосе поглощения Q_y-перехода для комплексов BoWSCP- Хл *a*, BoWSCP- Хл *b*, LvWSCP- Хл *a* и LvWSCP- Хл *b* [Palm et al., 2018]. Полученные модельные спектры показаны на рисунке 16.

Итоговые смоделированные спектры холобелков WSCP с различной долей Хл *b* в них создавались по формуле:

$$WSCP(\lambda) = (1 - \beta) * WSCP_A(\lambda) + \beta * WSCP_B(\lambda) \quad (1)$$

где β – процент содержания Хл *b* в тетрамере WSCP; WSCP_A(λ) и WSCP_B(λ) – модельные спектры Хл *a* и Хл *b* в соответствующем холобелке WSCP;

В дальнейшем из полученной серии спектров, смоделированных для каждой процентной доли содержания Хл *b* в препарате, рассчитывали отношение величины пика поглощения Хл *b* в области полосы Core к величине пика поглощения в области Q_y-перехода; кривая изменения рассчитанного соотношения от процента содержания Хл *b* в комплексе показаны на рисунке 17.

2.13. Исследование спектральных свойств белков WSCP при изменении температуры и pH препарата

Измеряемые препараты BoWSCP и LvWSCP содержали буфер Бис-Трис-пропан/лимонная кислота (pH 8,0) в концентрации 20 мМ и имели начальную оптическую плотность в пике 660-680 нм равную 0,2.

В опытах по абсорбционной спектроскопии с разным pH препарата спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu 1601PC» («Shimadzu», Япония). Контроль значений pH образца осуществляли с помощью pH-метра «Эксперт-pH (микро)» с электродом «ЭСК-10614/7». В ходе опыта сначала измеряли спектр поглощения раствора, затем его pH изменяли на единицу либо в большую сторону добавлением 2М или 10М раствора NaOH, либо в меньшую сторону добавлением 1М или 3М раствора лимонной кислоты, а затем снова измеряли спектр поглощения.

В опытах по варьированию температуры препарата спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Beckman DU650» («Beckman Coulter», США). Повышение и понижение температуры образца осуществляли путём пропускания нагретой или охлажденной воды через водяную рубашку кюветодержателя. Контроль температуры осуществлялся через термический датчик «ТДС-3» рН-метра Эксперт-рН (микро) производителя «Эконикс-эксперт», который был погружен в кювету, находящуюся в том же кюветном держателе, что и образец.

2.14. Исследование изменений спектральных свойств белков WSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени

Переходные спектры поглощения измеряли методом фемтосекундной накачки в суперконтинуумный зонд. Выходной сигнал титан-сапфирового генератора (800 нм, 80 МГц, 80 фс, «Tsunami», «Spectra-Physics», США) усиливался регенеративной усилительной системой («Spitfire», «Spectra-Physics», США) с частотой повторения 1 кГц. Управление частотой лазерных импульсов производилось штатным устройством синхронизации и управления усилителем «SDG II Spitfire 9132» производства «Spectra-Physics» (США). Устройство позволяло изменять частоту повторения импульсов на выходе усилителя в диапазоне от 0 до 1000 Гц. Усиленные импульсы разделялись на два луча. Один из лучей направлялся в неколлинеарно согласованный по фазе оптический параметрический усилитель. Его выход был сжат парой кварцевых призм. Форма импульса была измерена несколькими способами, включая анализ функции автокорреляции, анализ спектра импульса, измерение электромагнитного поля с помощью спектральной фазовой интерферометрии для прямой реконструкции электрического поля (SPIDER) и анализ отклика когерентного спайка буфера. Анализ показывает, что форма импульса после параметрического усилителя близка к гауссовой [Черепанов и др., 2023].

Второй луч был сфокусирован на тонкой кварцевой ячейке с H_2O для генерации зондирующих импульсов суперконтинуума. Импульсы накачки и зондирования были задержаны по времени относительно друг друга с помощью управляемого компьютером этапа задержки. Затем они были ослаблены, рекомбинированы и сфокусированы на ячейке образца [Черепанов и др., 2023].

Возбуждение BoWSCP осуществлялось фемтосекундными лазерными импульсами с максимумами на длинах волн 430 нм (длительность – 40 фс, энергия – 20 нДж) и 670 нм (длительность – 16 фс, энергия – 15 нДж). Зондирование обеспечивалось широкополосными импульсами суперконтинуума при углах поляризации 0° , $54,7^\circ$ и 90° относительно поляризации возбуждающего импульса [Черепанов и др., 2023].

После прохождения через образец суперконтинуум рассеивался полихроматором («Acton SP-300») и детектировался ПЗС-камерой («Roper Scientific SPEC-10»). Переходные спектры

изменений поглощения $\Delta A(t, \lambda)$ регистрировались в диапазоне 400–780 нм. Измеренные спектры были скорректированы с учетом дисперсии групповой задержки суперконтинуума [Черепанов и др., 2023].

Эксперименты проводились при температуре 6 °С в проточной оптической ячейке (толщина – 0,5 мм, диаметр оптических окон – 0,2 мм, оптическая плотность измеряемого образца – 10 см^{-1}). Скорость циркуляции в проточной ячейке (9 мл/мин) была достаточно высокой, чтобы избежать многократного возбуждения одного и того же объема пробы [Черепанов и др., 2023].

Особое внимание было уделено «выбросу когерентности» или «когерентному артефакту», который виден в начале эволюции сигнала при перекрытии импульсов накачки и зондирования. Этот артефакт не позволяет должным образом проанализировать результаты измерений в этой точке. Учет когерентного артефакта и деконволюции аппаратной функции в области $t = 0$ проводили по методике, предложенной в работах Dobryakov и соавт. (2008; 2010).

Измеренные переходные спектры поглощения (далее - ТА, от «Transient Absorption spectra») раскладывали на такие три отдельные компоненты, как спектр выцветания основного состояния (далее - GSB, от «Ground State Bleaching spectra»), спектр поглощения возбужденного состояния (далее - ESA, от «Excited State Absorption spectra») и спектр выцветания в области стимулированного излучения (далее - BL, от BLeaching in the stimulated emission region) [Черепанов и др., 2023].

В области, где отсутствует вклад стимулированного излучения (400–500 нм за исключением области 450–480 нм, где преобладает поглощение Хл *b*) ТА можно представить, как сумму двух компонент - GSB и ESA. Предполагается, что GSB-спектр по форме совпадает со спектром поглощения комплекса (но с обратным знаком), а ESA-спектры состояний S_1 и S_3 являются гладкими функциями и могут быть корректно описаны полиномами третьей степени $P_3(\lambda)$. Итого в данной области спектра амплитуда переходных спектров поглощения была аппроксимирована выражением:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = \xi \times \Delta A_{GSB}(\lambda) + P_3(\lambda) \quad (2)$$

где ξ - масштабирующий множитель. Множитель ξ и коэффициенты кубического полинома P_3 находились стандартным решением задачи линейной регрессии. После вычисления множителя ξ спектр ESA может быть рассчитан через полученную из уравнения (2) разность ТА-спектра и GSB-спектра, умноженного на масштабирующий множитель ξ [Черепанов и др., 2023].

В области, где вклад стимулированного излучения присутствует (вблизи полосы Q_y -перехода), ТА представляли, как сумму двух компонент – BL-спектра и ESA-спектра. BL-спектр, в свою очередь, представляли как умноженную на количество экситонно-сопряженных молекул сумму GSB-спектра (с коэффициентом ξ) и спектра стимулированного излучения; спектр

стимулированного излучения же был зеркальным отражением GSB-спектра (тоже с коэффициентом ξ) относительно максимума полосы поглощения $Q_y \lambda_0$ со сдвигом Стокса $\Delta\lambda$. Итого форма BL-спектра была аппроксимирована выражением:

$$\Delta A_{BL}(\lambda) = n_{excited} \times \xi \times [\Delta A_{GSB}(\lambda) + \Delta A_{GSB}(\lambda_0 + \Delta\lambda - \lambda)] \quad (3)$$

Где $n_{excited}$ - эффективное число экситонно-сопряженных молекул, ξ - масштабирующий множитель, λ_0 - максимума полосы поглощения Q_y , а $\Delta\lambda$ - сдвиг Стокса [Черепанов и др., 2023].

Поскольку положение 0-0-перехода оставалось неизвестным, величину сдвига Стокса $\Delta\lambda$ спектра стимулированного излучения находили нелинейной минимизацией суммарного модельного спектра, в котором ESA-спектр, как и в уравнении (3) был описан в виде полинома $P_3(\lambda)$:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = n_{excited} \times \xi \times [\Delta A_{GSB}(\lambda) + \Delta A_{GSB}(\lambda_0 + \Delta\lambda - \lambda)] + P_3(\lambda) \quad (4)$$

Эффективное число экситонно-сопряженных молекул $n_{excited}$ и коэффициенты полиномиальной функции P_3 находили методом линейной регрессии [Черепанов и др., 2023].

2.15. Условия проведения фотохимических экспериментов

В ходе выполнения фотохимических экспериментов в качестве источника возбуждающего излучения использовали осветитель "Свитель-М", снабженный галогеновой лампой ($W=150$ Вт) и зеркально-линзовым комбинированным конденсором с функцией теплового фильтра. На оптической оси прибора последовательно находились: дополнительный тепловой водяной фильтр толщиной 3 см, фокусирующая линза ($F = 97$ мм), система стеклянных светофильтров, обеспечивающих получение требуемого спектрального диапазона, а также кювета с образцом, помещённая на магнитную мешалку.

В опытах с холобелками BoWSCP и LvWSCP использовали светофильтр KC-15 (5 мм), пропускающий свет с длиной волны >650 нм, с итоговым квантовым потоком излучения фотосинтетически активной радиации (ФАР) $1800 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$. В дополнение к светофильтру KC-15 также устанавливали нейтральные светофильтры HC-6, HC-7, HC-7+HC-6 и HC-8, в итоге получая около 60,0% ($1080 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$), 39,2% ($700 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$), 23,8% ($420 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) и 13,9% ($250 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) от интенсивности исходного светового потока соответственно. Интенсивность исходного потока ФАР определена с помощью радиометра «LI-250A» («LiCOR», США). Все эксперименты проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Экспериментальные пробы постоянно перемешивали на магнитной мешалке.

Во всех опытах использовали конечные концентрации холобелков BoWSCP и LvWSCP в кювете около 0,35-0,7 мкМ ($30-60 \mu g \times ml^{-1}$), при которых в реакционной смеси оптическая плотность Хл-белковых комплексов в пике поглощения в области Q_y -перехода равна 0,1 - 0,2.

Все компоненты реакционных смесей были растворены в буфере 10 mM Трис-HCl (pH 8,0) за исключением тех опытов, для которых состав буфера указан отдельно.

Чистый Хл *a* для фотохимических опытов в мицеллах детергента получал из клеток цианобактерии спироулины (*Arthrospira platensis*) Константин Викторович Неверов методом селективной экстракции и тонкослойной хроматографии [Quach et al, 2004; Zhiltsova et al., 2024]. Хлорофилл экстрагировали из биомассы смесью полярных растворителей (ацетон-этанол 7:2), потом в смесь добавляли н-гексан, куда переходили Хл и другие гидрофобные пигменты [Ritchie, 2004]. Фракцию гексана отделяли и наносили на хроматографические пластинки Silufol («Reanal», Чехия). Хроматографию проводили в системе гексан-ацетон 3:1 [Quach et al., 2004] в закрытых сосудах, предварительно насыщенных парами данной смеси растворителей. Полосу чистого Хл *a* вырезали из пластинки, а пигмент элюировали с сорбента ацетоном. Полученный ацетоновый раствор Хл *a* высушивали потоком аргона в стеклянной колбе при перемешивании до получения сухой равномерной плёнки пигмента. Плёнку хлорофилла непосредственно перед экспериментом смывали водной эмульсией 2% Тритона X-100 в 10 mM буфере Трис-HCl (pH 8,0), постоянно перемешивая раствор в течение 5 мин для обеспечения равномерной солиubilизации пигмента и предотвращения его агрегации.

Концентрацию NADH оценивали по оптической плотности в пике поглощения 340 нм, коэффициент молярной экстинкции E_{340} использовали 6220 л×моль⁻¹×см⁻¹ [Hald et al., 1975]. Концентрацию аскорбата оценивали по оптической плотности в пике поглощения 265 нм, коэффициент молярной экстинкции E_{265} использовали 14560 л×моль⁻¹×см⁻¹ [Karayannis et al., 1977].

Концентрацию цитохрома *c* в исходном препарате оценивали по оптической плотности в пике поглощения 550 нм в отсутствие белков WSCP и с добавлением железосинеродистого калия для полного окисления цитохрома. Использовали коэффициент молярной экстинкции E_{550}^{ox} , равный 8400 л×моль⁻¹×см⁻¹ [Van Gelder, Slater, 1962]. Концентрацию окисленного или восстановленного цитохрома *c* рассчитывали по изменению оптической плотности в пике поглощения при 550 нм, для расчета использовали разностный коэффициент молярной экстинкции ΔE_{550} , равный 21100 л×моль⁻¹×см⁻¹ [Van Gelder, Slater, 1962].

Устойчивость холобелков WSCP в ходе фотохимической реакции оценивали по проценту сохранившейся (в сравнении с начальной) оптической плотности в пике 660-680 нм (область Q_y -перехода), а устойчивость димерной структуры хромофоров – по проценту сохранившейся суммы величин отрицательного и положительного пика в области 600-700 нм на спектрах кругового дихроизма.

Аноксигенные условия обеспечивали, продувая пробы аргоном (чистота 99,9%) не менее 10 минут перед началом эксперимента: 7 минут с погружением иглы для продувки в раствор (ток

газа – не менее 8 мл×мин⁻¹) и, далее, не менее 3 минут с иглой над раствором для уменьшения последующего пенообразования (ток газа - не менее 30 мл×мин⁻¹). В части экспериментов использовали более интенсивную продувку аргоном – с током газа не менее 18 мл×мин⁻¹ при погружении иглы в раствор и током газа не менее 90 мл×мин⁻¹ при установке иглы над поверхностью раствора в кювете. Такие компоненты реакционной смеси, как цитохром с, NADH и аскорбат, добавляли после 7-минутной продувки препарата аргоном.

В опытах с добавлением ферментов супероксиддисмутазы и каталазы использовали следующие коммерческие препараты: супероксиддисмутазу – из бычьих эритроцитов, производства «SIGMA» S-2515, заявленная производителем активность 4200U на миллиграмм; каталазу – из бычьей печени, производства «SIGMA» C40-1G, заявленная производителем активность – не менее 10000U на миллиграмм. Каталаза была любезно предоставлена старшим научным сотрудником лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ «Биотехнологии» РАН, к.б.н. Н.Г. Лойко.

В опытах с добавлением азидата натрия (NaN_3) процентное соотношение времени жизни $^1\text{O}_2$ в растворе в присутствии тушителя (τ) к аналогичному времени в отсутствие тушителя (τ_0) рассчитывали по упрощенной формуле Штерна-Фольмера [Егоров, 2007]:

$$\tau/\tau_0 \text{ (в \%)} = \frac{1}{1 + Kq*[N_3^-]*\tau_0} \quad (5)$$

Где τ/τ_0 – степень уменьшения времени жизни молекулы (в % от исходной), Kq – константа взаимодействия азидата натрия и $^1\text{O}_2$, взята $4,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ [Егоров, 2007], $[N_3^-]$ – концентрация азидата в пробе (Моль×л⁻¹), τ_0 – время жизни $^1\text{O}_2$ в среде H_2O , взято $3,2 \times 10^{-6} \text{ сек}$ [Егоров, 2007].

2.16. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения «OriginPro 2021» («OriginLab Corporation», США). Она заключалась в расчёте среднего арифметического и стандартного отклонения на основании результатов опытов в не менее чем трёх независимых повторностях эксперимента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Выбор белков - объектов исследования (биоинформатическое обоснование)

В качестве объектов исследования мы сосредоточились на белках WSCP-II и не исследовали белки WSCP-I. Причины данного выбора подробно описаны в обзоре литературы и, в краткой форме, сводятся к следующему: (1) холобелки WSCP-II, в отличие от холобелков WSCP-I, не исследовали на предмет фотохимической активности и (2) в холобелках WSCP-II (но не в холобелках WSCP-I) показано присутствие молекул Хл в виде димеров (подобных димерам – «специальным парам» в реакционных центрах фотосистем). Также мы учитывали такие прикладные факторы, как относительная простота получения и бóльшая стабильность пигментного состава холобелков WSCP-II по сравнению с холобелками WSCP-I (благодаря отсутствию фотоконверсии).

Из всего семейства WSCP-II только для представителей *Brassica oleracea* var. *botrytis* (далее BoWSCP, без упоминания подвида растения) и из *Lepidium virginicum* (LvWSCP) известны трехмерные структуры и достоверно показана димерная укладка молекул Хл. Для выбора из этих двух белков основного объекта фотохимического исследования мы провели биоинформатическое исследование, параметры которого описаны в главе 3.1.1 раздела «Материалы и методы». В результате данного исследования мы пришли к следующим выводам: (1) группы IIA и IIB белков WSCP филогенетически обособлены друг от друга; (2) белок BoWSCP принадлежит к более многочисленной и разнообразной филогенетической группе белков подкласса IIA с более простым пигментным составом комплексов (в основном связывают лишь Хл *a*); (3) белок LvWSCP принадлежит к менее многочисленной филогенетической группе белков подкласса IIB с более сложным пигментным составом комплексов (связывают Хл *a* и Хл *b*). Выводы эти дополнительно подтверждаются исследованием Prabagar и соавт. (2020), которое было опубликовано одновременно с окончанием нашего исследования и в определенной степени его дублировало. Исходя из данных фактов, мы выбрали белок BoWSCP в качестве основного объекта нашего исследования, а белок LvWSCP – как дополнительный объект исследования в ограниченном числе опытов.

Отдельно хочется отметить результаты, которые были получены в нашем биоинформатическом исследовании и которые имеют ценность для обсуждения возможной функциональной роли данных белков. Среди общих для белков BoWSCP и LvWSCP последовательностей гомологов выявлено как минимум 155 последовательностей, у которых после полиглицинового участка в третьей позиции находился пролин (GGGxxP) – аминокислотный остаток, имеющий исключительную важность для связывания Хл белками WSCP-II. Часть этих последовательностей не была охарактеризована как белки WSCP и, что

более важно, не была связана с растениями семейства *Brassicaceae*. В качестве примера можно привести «Miraculin» из *Artemisia annua* (A0A2U1Q6C0), «Kunitz trypsin inhibitor» из *Nicotiana tabacum* (B8Y888), «Miraculin-like sequence» из *Capsicum annuum* (A0A2G2ZCU6). Более того, у белка из *Artemisia annua* также присутствовал LHC-II подобный мотив «CPLGI», а у белков из *Nicotiana tabacum* и *Capsicum annuum* данный мотив отличался на две аминокислоты (CPRDI). Были обнаружены и неохарактеризованные последовательности с похожими особенностями, имевшие происхождение из не относящихся к семейству *Brassicaceae* растений родов *Gossypium*, *Delonix*, *Lactuca*, *Cuscuta*, *Solanum*, *Eutrema*, *Capsella*, и др.

Таким образом, важные для связывания Хл белками WSCP-II участки «GGGxxP» и LHC-II-подобный мотив обнаруживаются (помимо самих белков WSCP-II) в дальних гомологах белков WSCP вне семейства *Brassicaceae*, что потенциально размывает таксономические границы данной группы белков и создаёт перспективы открытия её новых представителей в других семействах растений.

3.2. Электрофоретическая и спектроскопическая характеристика препаратов холобелков BoWSCP и LvWSCP с целью оценки нативности их структуры

Препараты апо- и холобелков BoWSCP и LvWSCP получали согласно протоколам, взятым из литературных источников или основанным на рекомендациях из них (см. раздел «Материалы и методы»). Схематично процесс получения холобелков WSCP приведён на рисунке 11. С учётом поставленной в работе задачи и того факта, что мы модифицировали некоторые протоколы, особое внимание было уделено оценке нативности исследуемых препаратов белков WSCP-II.

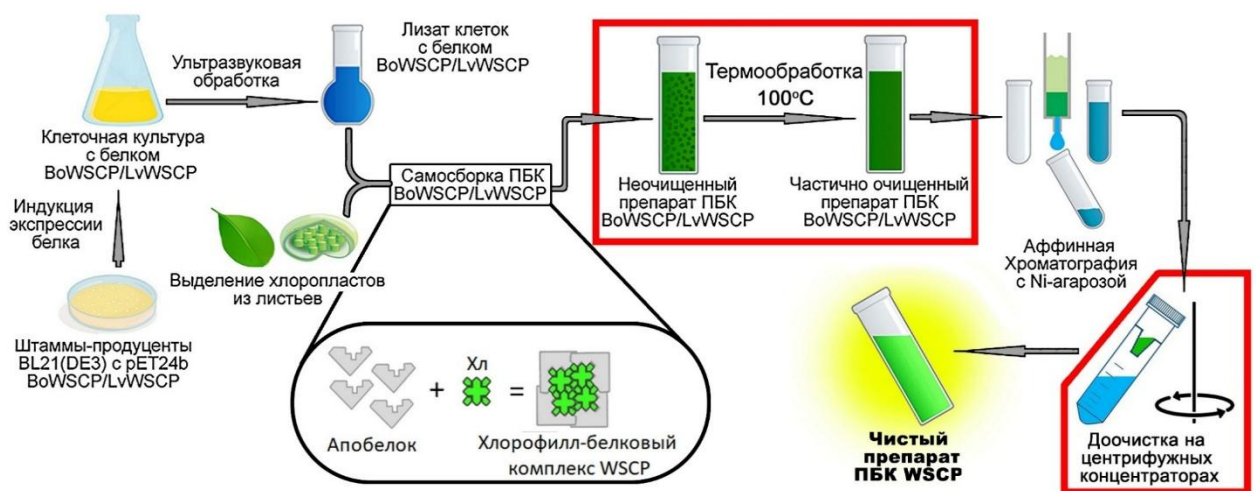


Рисунок 11. Схематическое описание процесса получения препаратов ПБК (холобелков) WSCP-II. Красным выделены дополнительные этапы очистки, которые были добавлены нами по сравнению с опубликованными в литературе протоколами.

Для характеристики гомогенности и чистоты препаратов, а также для оценки молекулярной массы содержащихся в них белков использовали метод денатурирующего

электрофореза в ПААГ по Лэммли. Оба апобелка, BoWSCP и LvWSCP, проявляли электрофоретическую подвижность, соответствующую белкам с молекулярной массой около 20 кДа и соответствующую ожидаемой подвижности апобелков WSCP с полигистидиновым концом (рисунок 12). Препараты холобелков дополнительно проявляли белковую полосу с подвижностью около 40-45 кДа, очевидно являющуюся результатом неполного разделения в денатурирующих условиях тетрамерных комплексов на димеры вместо мономеров.

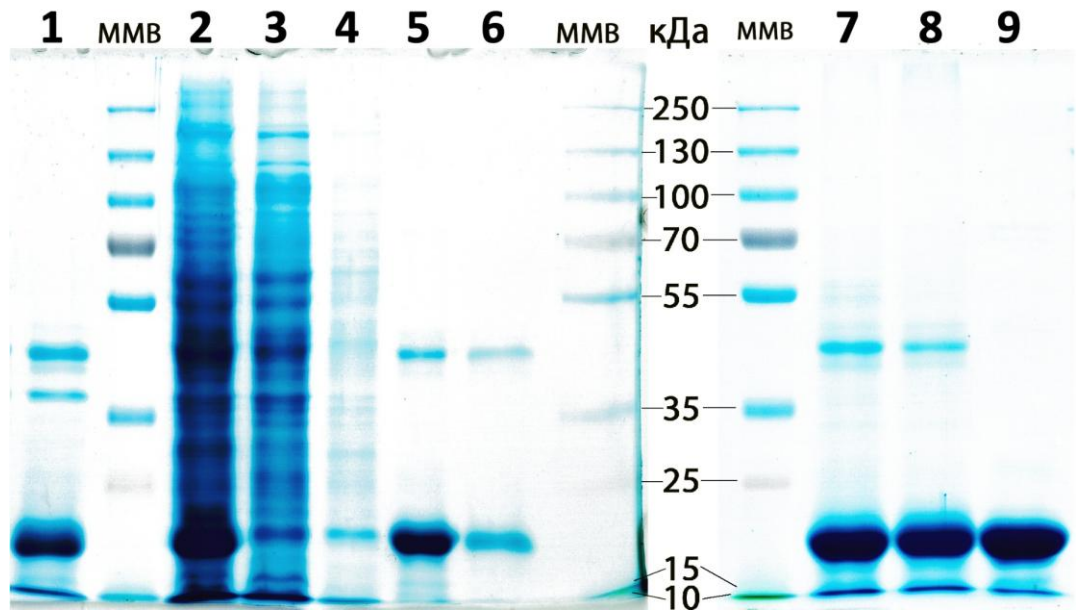


Рисунок 12. Результаты денатурирующего электрофореза в 10% ПААГ препаратов холобелков LvWSCP на разных стадиях получения и очистки. 1 – препарат лизата клеток с LvWSCP после самосборки с тилакоидами и последующей термообработки; 2 – препарат лизата клеток с LvWSCP после самосборки с тилакоидами без термообработки, внесённый на колонку с Ni-NTA; 3 – препарат из п.2, сошедший с колонки с Ni-NTA; 4 – фракция белков, сошедших с колонки после внесения раствора с 10 мМ имидазола; 5 – фракция белков, сошедших с колонки после внесения раствора с 50 мМ имидазола; 6 – фракция белков, сошедших с колонки после внесения раствора с 300 мМ имидазола; 7 – препарат холобелка LvWSCP, очищенный без применения термообработки; 8 – препарат холобелка LvWSCP, очищенный с применением термообработки; 9 – контрольный препарат апобелка LvWSCP; MMB – маркер молекулярных масс «Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #26619».

Для получения препаратов холобелков инкубировали препараты апобелков (или содержащий апобелки лизат клеток) со свежевыделенным из листьев шпината осадком тилакоидов. Базируясь на экспериментально перепроверенных нами данных литературы о термической устойчивости холобелков BoWSCP и LvWSCP [Kamimura et al., 1997; Schmidt et al., 2003; Bektas et al., 2012, Palm et al., 2017], в качестве способа предварительной очистки

холобелков WSCP-II от белков бактериальной природы и белков из тилакоидов мы использовали прогревание растворов. Следует сказать, что термообработку ранее уже использовали при очистке белков WSCP, выделенных из растительного материала [Kamimura et al., 1997], а также для белков, полученных путём гетерологичной экспрессии с последующей самосборкой *in vitro* чистыми препаратами пигментов [Palm et al., 2017], однако для очистки холобелков после их самосборки в смеси лизата клеток и препарата тилакоидов её не применяли. Высокая температура была успешно использована для предварительной очистки препаратов холобелков WSCP от посторонних белков бактериальной и растительной природы: результаты нативного электрофореза белков в ПААГ демонстрировали, что препараты получаемых нами холобелков, в отличие от белков из препаратов тилакоидов или бактерий, не лишались пигмента и не деградировали в результате термообработки.

Для оценки пигментного состава полученных холоформ белков LvWSCP и BoWSCP и для анализа межпигментных взаимодействий в них мы регистрировали спектры поглощения препаратов этих холобелков при комнатной температуре, а также спектры эмиссии флуоресценции. Кроме того, для подтверждения наличия димеров Хл в составе препаратов холобелков мы проводили регистрацию их спектров кругового дихроизма. Присутствие димеров Хл в холобелках WSCP важно для интерпретации проявлений фотохимической активности препаратов и демонстрации нативности их Хл-белковых комплексов.

На спектре поглощения полученных нами препаратов холобелков BoWSCP (рисунок 13) присутствует основной пик поглощения в красной области спектра при 673 нм вместе с минорным пиком при 628 нм (соответствующие Q_y – переходу в молекуле Хл), а также пики полосы Core 437, 423, 342 и 383 нм. Аналогично на спектре поглощения холобелков LvWSCP присутствуют пики поглощения в красной области спектра при 663 и 620 нм (Q_y – переход), а также пики полосы Core при 470, 440, 421, 381 и 339 нм. Данные спектры поглощения холобелков BoWSCP и LvWSCP совпадают с опубликованными спектрами поглощения данных холобелков, полученных при самосборке с тилакоидными мембранами, и с опубликованными спектрами этих же холобелков, выделенных из растительного материала [Murata, Ishikawa, 1981; Kamimura et al., 1997; Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013; Girr, Paulsen, 2021].

Спектры поглощения холобелков LvWSCP (рисунок 13) имеют дополнительный пик поглощения при 470 нм, который принадлежит Хл *b* в их составе. Данный пигмент активно связывается с мономером LvWSCP (доля Хл *b* от суммарного Хл – от 22% до 40%) при взаимодействии последнего с выделенными тилакоидами, при этом с мономером BoWSCP в аналогичных условиях этот пигмент связывается в меньших количествах (доля Хл *b* от суммарного Хл – до 14%) [Satoh et al., 2001].

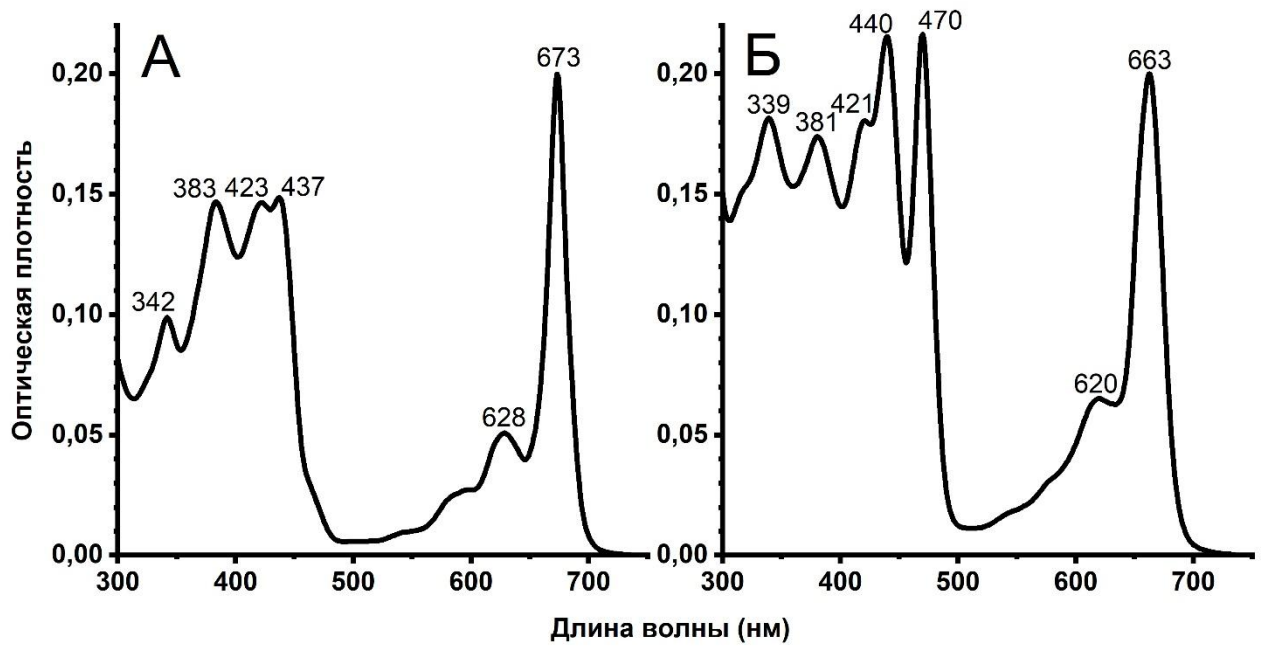


Рисунок 13. Спектр поглощения Хл-белковых комплексов BoWSCP (А) и LvWSCP (Б).

Пики поглощения красного света в области Q_y -перехода у обоих холобелков смещены относительно друг друга примерно на 10 нм (BoWSCP – 628 и 673 нм против LvWSCP – 620 и 663 нм). Данный факт подробно описан в обзоре литературы и объясняется различающимся влиянием аминокислотного окружения вокруг пигмента [Bednarczyk et al., 2016].

Спектры флуоресценции Хл-белковых комплексов BoWSCP были измерены при возбуждении светом в полосу Core Хл *a* (435 нм), а спектры флуоресценции Хл-белковых комплексов LvWSCP были измерены при возбуждении в полосу Core как Хл *a* (430 нм) и Хл *b* (470 нм). Измеренные спектры флуоресценции (рисунок 14) совпадают со спектром флуоресценции Хл *a* в биологических системах, в том числе со спектром флуоресценции нативных Хл-белковых комплексов BoWSCP и LvWSCP [Bednarczyk et al., 2015]. Совпадение спектров флуоресценции LvWSCP при возбуждении светом 430 нм и светом 470 нм указывает на то, что Хл *a* в составе данных холобелков является единственным флуоресцирующим пигментом, а Хл *b* в составе данных холобелков полностью передаёт свою энергию возбуждения на Хл *a*, вызывая флуоресценцию последнего. Данный перенос энергии возбуждения от молекулы Хл *b* на Хл *a* в составе холобелков WSCP-II также уже был описан в литературных источниках [Theiss et al., 2007], и его наблюдение дополнительно подтверждает нативность полученных нами препаратов LvWSCP.

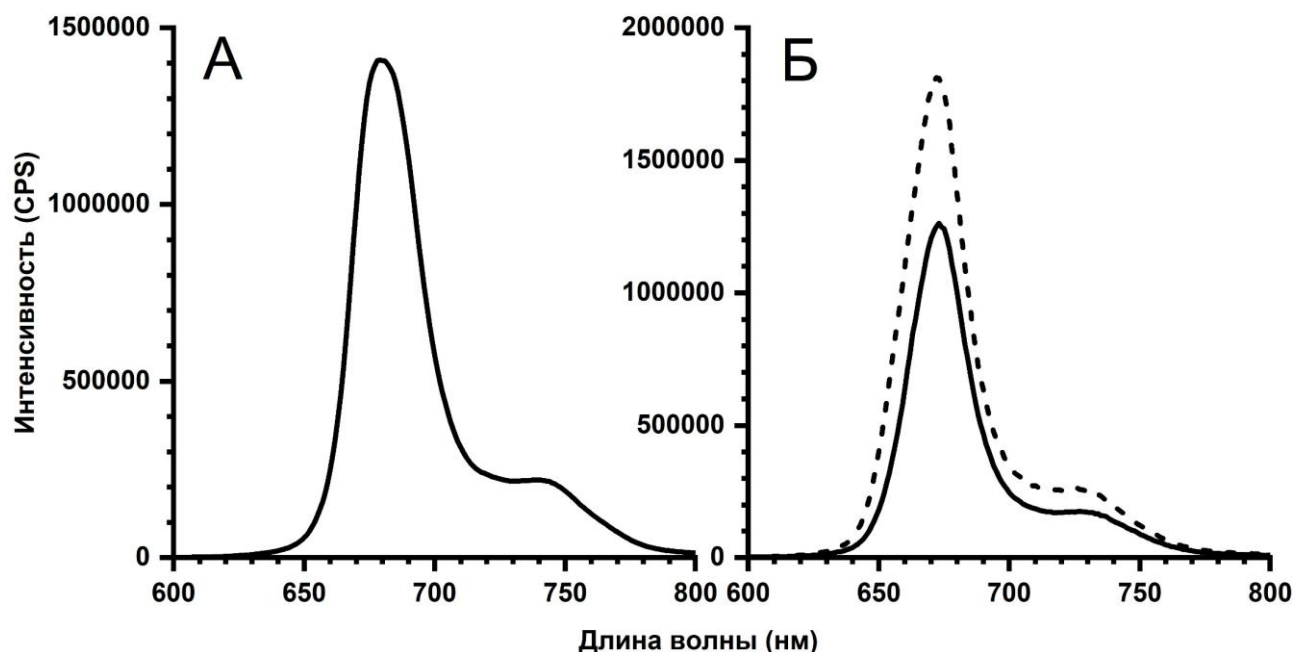


Рисунок 14. (А) – Спектр флуоресценции холобелков BoWSCP при температуре 20 °С. Длина волны возбуждения – 435 нм. (Б) – Спектры флуоресценции холобелков LvWSCP при температуре 20 °С. Длины волн возбуждения – 470 нм (сплошная линия) и 430 нм (пунктирная линия).

Для изучения состояния димерной структуры хромофорных групп внутри препаратов холобелков BoWSCP и LvWSCP проводили измерение их спектров кругового дихроизма в области поглощения 300-750 нм. При измерении данного спектра прибор фиксирует разницу в поглощении света правой круговой поляризации и левой круговой поляризации. Если две одинаковых молекулы пигмента расположены в виде димера со свободным переносом энергии, то этот димер обладает двумя возбужденными состояниями, по-разному поглощающими свет с разной круговой поляризацией. Вследствие данных особенностей димер молекул Хл на спектре кругового дихроизма проявляется в виде двух симметричных, но разнонаправленных пиков в видимой области спектра [Клейтон и др., 1984; Фрайфелдер, 1980].

На измеренных нами спектрах кругового дихроизма холобелков BoWSCP и LvWSCP (рисунок 15) присутствовали два симметричных и разнонаправленных пика (так называемая «бабочка») в области 600-700 нм (соответствует поглощению Хл *a* в области Q_y -перехода). Присутствие симметричных разнонаправленных пиков на спектрах кругового дихроизма холобелков BoWSCP и LvWSCP, как и общее их совпадение с аналогичными спектрами из литературных источников, говорит о присутствии в составе холобелков димеров Хл и нативности их структуры.

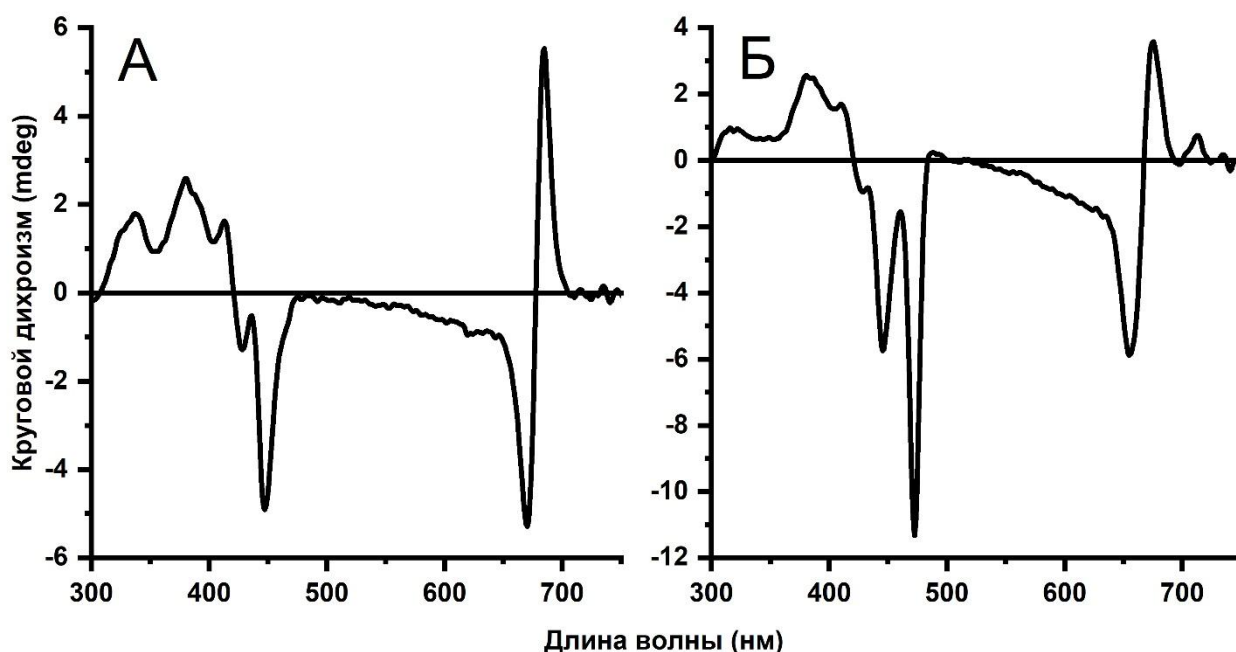


Рисунок 15. Спектр кругового дихроизма препарата холобелков BoWSCP (А) и препарата холобелков LvWSCP (Б).

Пигментный состав полученных препаратов холоформ BoWSCP и LvWSCP определяли путём анализа их спектров поглощения. Метод анализа основан на следующих двух фактах: (1) разница в интенсивности пика поглощения в области Q_y -перехода (640-680 нм) между Хл *a* и Хл *b* в составе холобелков WSCP невелика (у Хл *a* данный пик в 1,3-1,4 раза больше, чем у Хл *b*) и (2) Хл *b* в составе WSCP имеет пик поглощения при 463-468 нм в два раза более интенсивный, чем пик в области Q_y -перехода (640-680 нм), но у Хл *a* данный пик отсутствует [Palm et al., 2018]. Из этого можно сделать вывод, что при увеличении доли Хл *b* в холобелках WSCP-II отношение величины пика поглощения при 463-468 нм к величине пика поглощения при 640-680 нм ($OD_{463-468} / OD_{640-680}$, далее – «соотношение поглощений») будет неизменно увеличиваться, и данное «соотношение поглощений» можно использовать для определения соотношения Хл *a* и Хл *b* в холобелках WSCP-II, если предварительно построить график взаимозависимости этих величин. Для построения данного графика получали спектры поглощения BoWSCP-Хл *a*, LvWSCP-Хл *a*, BoWSCP-Хл *b* и LvWSCP-Хл *b* путём оцифровки и усреднения спектров соответствующих комплексов из изображений в литературных источниках [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013; Palm et al., 2017; Palm et al., 2018]. Полученные спектры нормировали в пике поглощения 640-680 нм на опубликованные в литературе коэффициенты молярной экстинкции [Palm et al., 2018]. Подробнее процедура описана в разделе «Материалы и методы». Спектры поглощения BoWSCP-Хл *a*, LvWSCP-Хл *a*, BoWSCP-Хл *b* и LvWSCP-Хл *b* в диапазоне 350-700 нм приведены на рисунке 16.

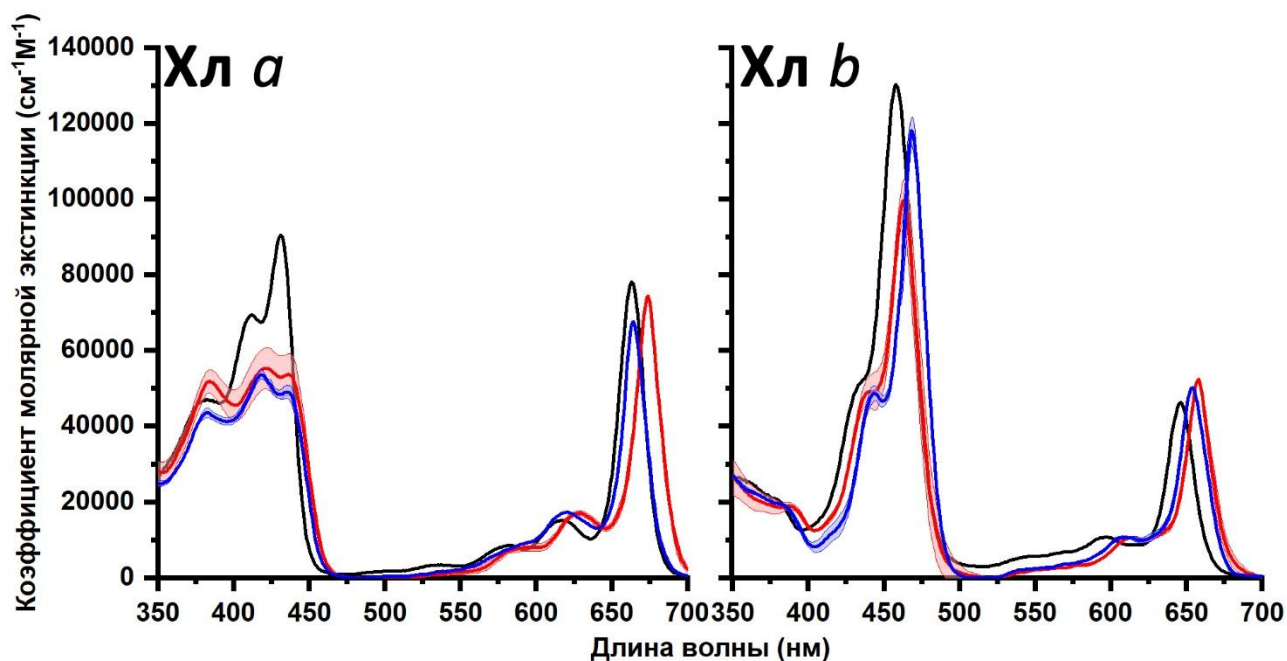


Рисунок 16. Спектры поглощения в диапазоне 350-700 нм Хл *a* (слева, черная) и Хл *b* (справа, черная) в 90%-ном ацетоне [Clementson et al., 2019], а также усредненные спектры BoWSCP - Хл *a* (слева, красная), LvWSCP - Хл *a* (слева, синяя), BoWSCP - Хл *b* (справа, красная), LvWSCP - Хл *b* (справа, синяя). Спектры поглощения чистых пигментов в белках WSCP были извлечены из литературных источников [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012; Takahashi, Yanai et al., 2013; Palm et al., 2017; Palm et al., 2018] методом оцифровки изображений с последующим усреднением. Полупрозрачным цветом выделено стандартное отклонение.

При использовании показанной на рисунке 17 зависимости было выяснено, что в наших препаратах BoWSCP содержится от 7 до 10% Хл *b*, что укладывается в описанный в литературе диапазон 0,9-14,3% (соотношение 10:1 - 6:1) [Satoh et al., 2001]. Используемые в фотохимических опытах препараты холобелка LvWSCP обладали «соотношением поглощений» около 0,69, что соответствует содержанию Хл *b* в них 31-33%. В то же время, в опытах по измерению спектров поглощения при разном pH и температуре использовали препараты LvWSCP с «соотношением поглощений» около 0,96, которое соответствует содержанию Хл *b* в них 41-43%, что незначительно (на 1-3%) превосходит максимальное соотношение Хл *a* / Хл *b* для данных белков (1,5:1 или 40%), упомянутое Satoh и соавторами (2001).

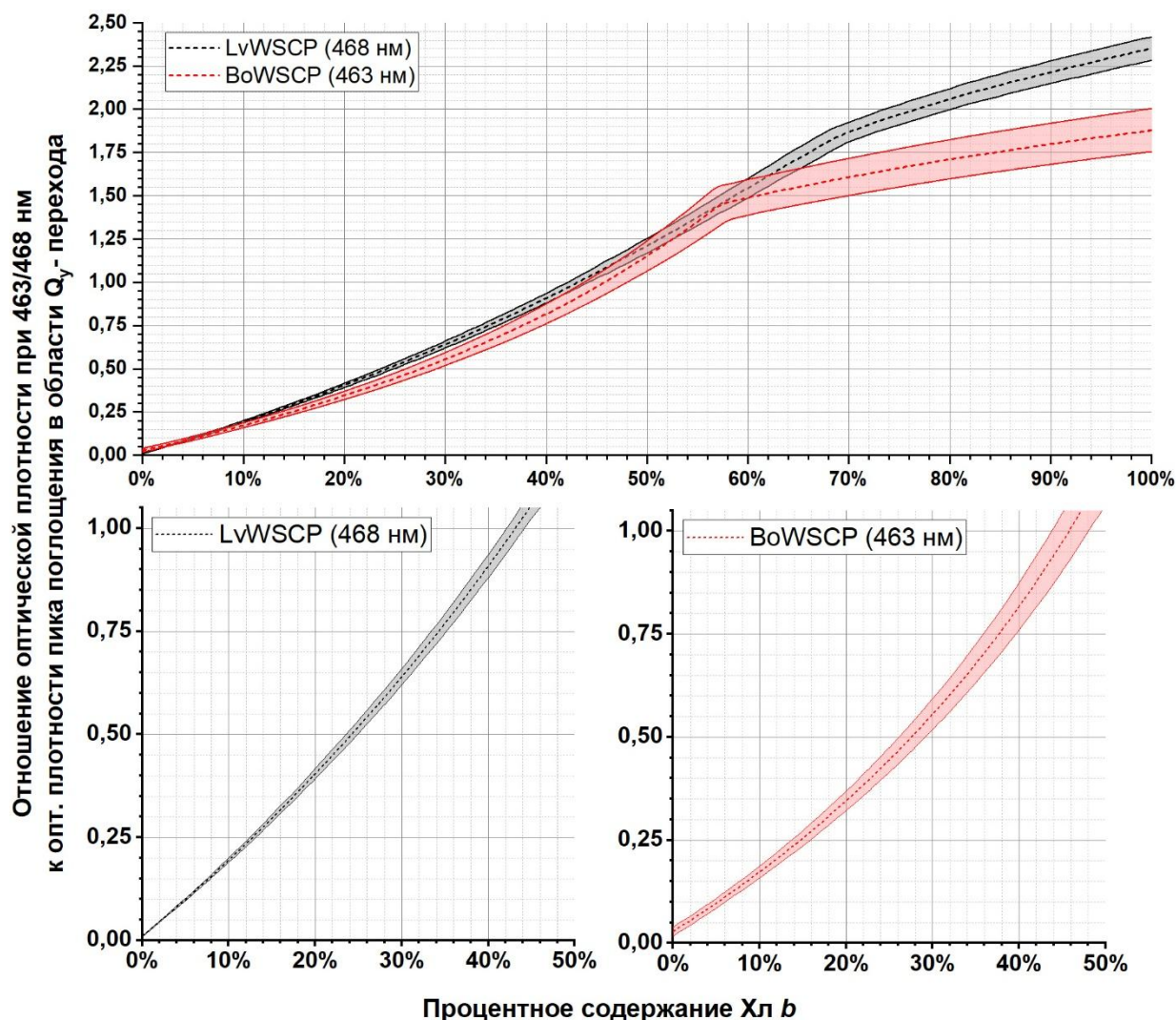


Рисунок 17. График взаимозависимости «соотношения поглощений» в BoWSCP (красная линия) и LvWSCP (чёрная линия) от процента содержания Хл *b* в препарате соответствующего холобелка. Вверху показаны полномасштабные (0-100% Хл *b*) кривые для комплексов BoWSCP и LvWSCP, внизу показаны два отдельных графика для комплексов LvWSCP (слева) и BoWSCP (справа) с укрупнённым диапазоном процентного содержания Хл *b* от 0 до 50%. Полупрозрачной заливкой указан диапазон ошибки.

3.3. Исследование фотохимических свойств Хл-белковых комплексов белков BoWSCP и LvWSCP

В данной части работы мы изучили возможность участия хромофоров в составе холобелков WSCP-II в фотосенсибилизированных редокс-реакциях. Мы не ставили задачу реконструкции электронного транспорта, аналогичного фотосинтетическому, но проверяли возможность функционирования фотовозбуждённых Хл в составе холобелков WSCP-II как участников редокс-реакций с участием различных доноров и акцепторов электрона.

Эта часть работы сложена из двух не связанных друг с другом направлений: (1) анализ свидетельств фотохимической активности возбужденного хлорофилла в составе WSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени после импульсного возбуждения светом и (2) определение фотохимической активности холобелков WSCP в рамках фотохимических опытов с экзогенными донорами и акцепторами электрона при постоянном облучении красным светом.

3.3.1. Выявление наиболее ранних свидетельств фотохимической активности холобелков WSCP, проявляющихся спустя фемто- и пикосекунды после возбуждения светом

С целью анализа процессов, происходящих в холобелках BoWSCP в течение пикосекунд после поглощения квантов света, мы совместно с коллегами из ФИЦ ХФ РАН измерили абсорбционную динамику холоформы BoWSCP, индуцированную возбуждением в области длин волн 430 и 670 нм, методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Длины волн 430 и 670 нм были выбраны по той причине, что возбуждение в этих спектральных областях связано преимущественно с Хл *a* (квантовый выход > 98%) и лишь в малой степени – с Хл *b* (< 2%) [Черепанов и др., 2023].

Методом фемтосекундной спектроскопии были получены переходные спектры поглощения холобелков BoWSCP, фиксирующие разницу между спектрами поглощения без предварительного возбуждения и спустя некоторое время после возбуждения препарата импульсом света. На данных спектрах (рисунок 18) амплитуда выцветания пика поглощения Q_y в несколько раз превышает амплитуду выцветания полосы Core, тогда как в спектре поглощения BoWSCP (рисунок 13) пик поглощения Q_y сравним по амплитуде с полосой Core. Различие между кривыми «670 нм» и «430 нм» в области Q_y -перехода на временной задержке 50 фс можно объяснить отрицательным вкладом в кривую «670 нм» стимулированного излучения перехода $S_1 \rightarrow S_0$, которое на кривой «430 нм» отсутствует. На временной задержке 200 пс уже должны завершиться процессы внутримолекулярной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$ и должно установиться тепловое равновесие в распределении экситонных состояний. Соответственно, к данному времени переходные спектры поглощения при возбуждении в 670 нм и 430 нм должны совпасть, и они действительно близки во всем диапазоне за исключением полосы Q_y , где амплитуда выцветания после возбуждения на длине волны 670 нм всё ещё значительно превосходит выцветание, индуцированное возбуждением на длине волны 430 нм. Наиболее значимые абсорбционные изменения BoWSCP при сравнении переходных спектров с задержкой 50 фс и 200 пс (рисунок 18) связаны с увеличением амплитуды выцветания полосы Q_y после возбуждения светом 430 нм (в противоположность уменьшения этой же амплитуды после возбуждения светом 670 нм) [Черепанов и др., 2023].

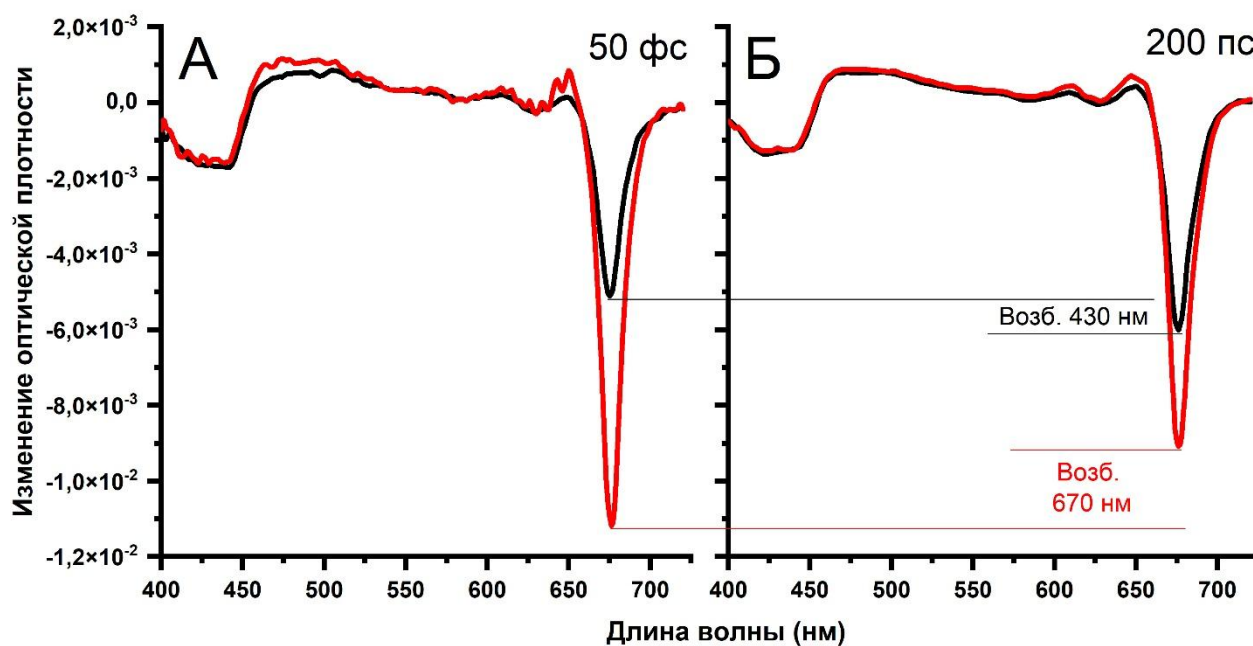


Рисунок 18. Переходные спектры поглощения VoWSCP при задержках 50 фс (А) и 200 пс (Б) после возбуждающего импульса на длинах волн 430 нм (черный) и 670 нм (красный). Спектры нормированы по области полосы Core 400–500 нм при задержке 200 пс; угол поляризации – 54,7° [Черепанов и др., 2023].

Попытка охарактеризовать данный процесс с помощью разложения абсорбционной динамики на экспоненциальные компоненты, связанные с распадом (Decay Associated Spectra, DAS) выявила, что в фемтосекундном диапазоне после возбуждения при длине волны 430 нм основные спектральные изменения в переходных спектрах поглощения происходят с характерным временем 83 ± 9 фс (рисунок 19А, чёрная кривая); эти изменения могут быть приписаны внутримолекулярной безизлучательной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$, в результате которой исчезает стимулированное излучение в области полосы Core (450 – 480 нм) и появляется стимулированное излучение в области полосы Q_y (670–690 нм). В пикосекундном диапазоне значимые изменения поглощения происходят с характерным временем ~ 16 пс и связаны с незначительным по амплитуде восстановлением поглощения в области полосы Q_y с максимумом около 675 нм (рисунок 19Б) [Черепанов и др., 2023].

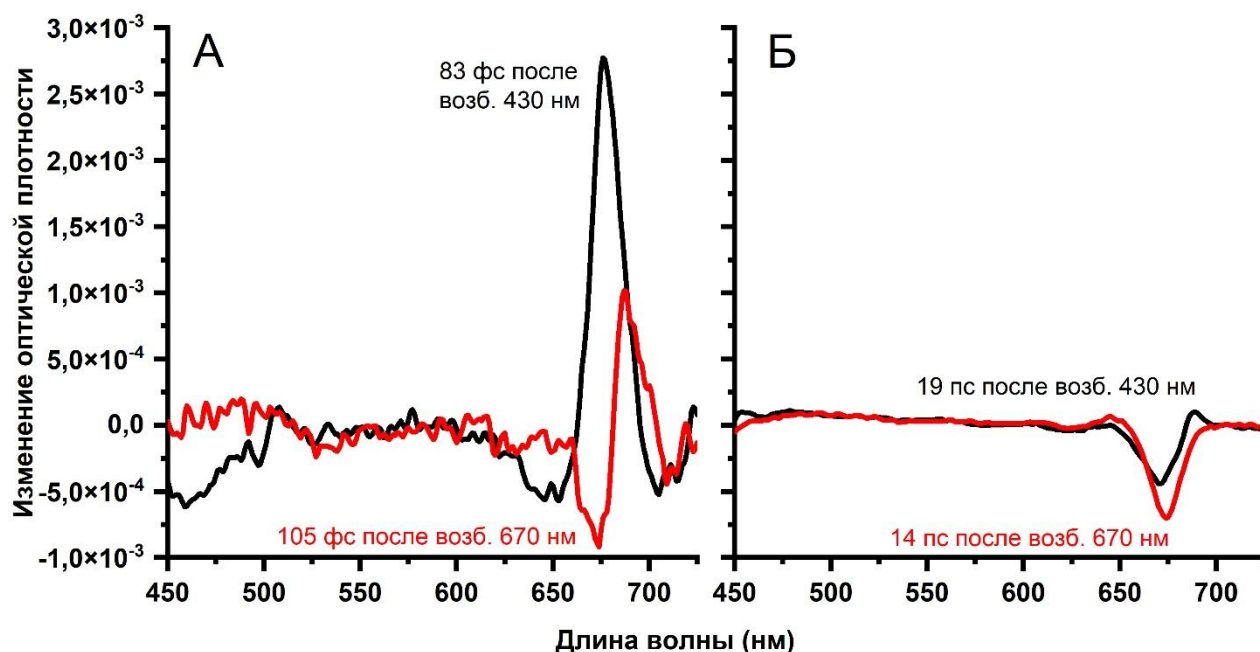


Рисунок 19. Ассоциированные с экспоненциальным распадом спектры BoWSCP в диапазоне 100 фс (А) и 10 пс (Б) после возбуждения на длинах волн 430 нм (черные) и 670 нм (красные). Характерные времена проиллюстрированных изменений: А, черная – 83 фс; А, красная – 105 фс; Б, черная – 19 пс; Б, красная – 14 пс [Черепанов и др., 2023].

Отдельно важно подчеркнуть небольшие спектральные изменения, которые происходят в диапазоне времени 105 ± 10 фс после возбуждения BoWSCP в области полосы Q_y на длине волны 670 нм (рисунок 19А, красная кривая). Поскольку Хл в составе холобелков WSCP упакован в виде именно экситон-связанных димеров молекул Хл, а не одиночных молекул Хл, то полоса поглощения Q_y определяется не соответствующим одиночным вектором дипольного момента перехода Q_y ($S_0 \rightarrow S_1$) как в одиночной молекуле Хл *a*, а суммами проекций данных векторов двух экситонно сопряженных молекул Хл *a* на оси координат $X(E_1)$, $Y(E_3)$ и $Z(E_2)$ (рисунок 20В). Эти изменения могут быть отнесены к релаксационному переходу между двумя экситонными уровнями E_1 и E_2 полосы Q_y димера Хл *a*. Важно, что даже после наступления теплового равновесия относительный вклад состояния E_1 (обладающего наибольшей энергией) уменьшается лишь до $\approx 80\%$, т.е. оно является доминирующим, тогда как доля состояний с меньшей энергией составляет оставшиеся $\approx 20\%$ [Черепанов и др., 2023].

Данное распределение вкладов экситонных состояний E_1 и E_2 после наступления теплового равновесия согласуется с результатами разложения спектра поглощения и спектра кругового дихроизма на вклады экситонных состояний E_1 и E_2 (рисунок 20АБ), согласно которому высокоэнергетическое экситонное состояние E_1 (672 нм) имеет долю в 79%, а низкоэнергетическое экситонное состояние E_2 (684 нм) – 21% (долю состояния E_3 выявить не удалось). В совокупности оба данных результата согласуются с упомянутой в обзоре литературы

характеристикой димера Хл в конфигурации «открытый сэндвич» [Agostini et al., 2017; Agostini, Palm et al., 2018], описывающей его как уникальную энергетическую структуру, в которой, в отличие от специальной пары, преобладает вклад наиболее высокоэнергетического экситонного состояния E_1 . Подтверждение данной энергетической структуры очень важно для правильной интерпретации результатов фотохимических опытов и построения предположений о физиологической роли холобелков WSCP разделе «Обсуждение».

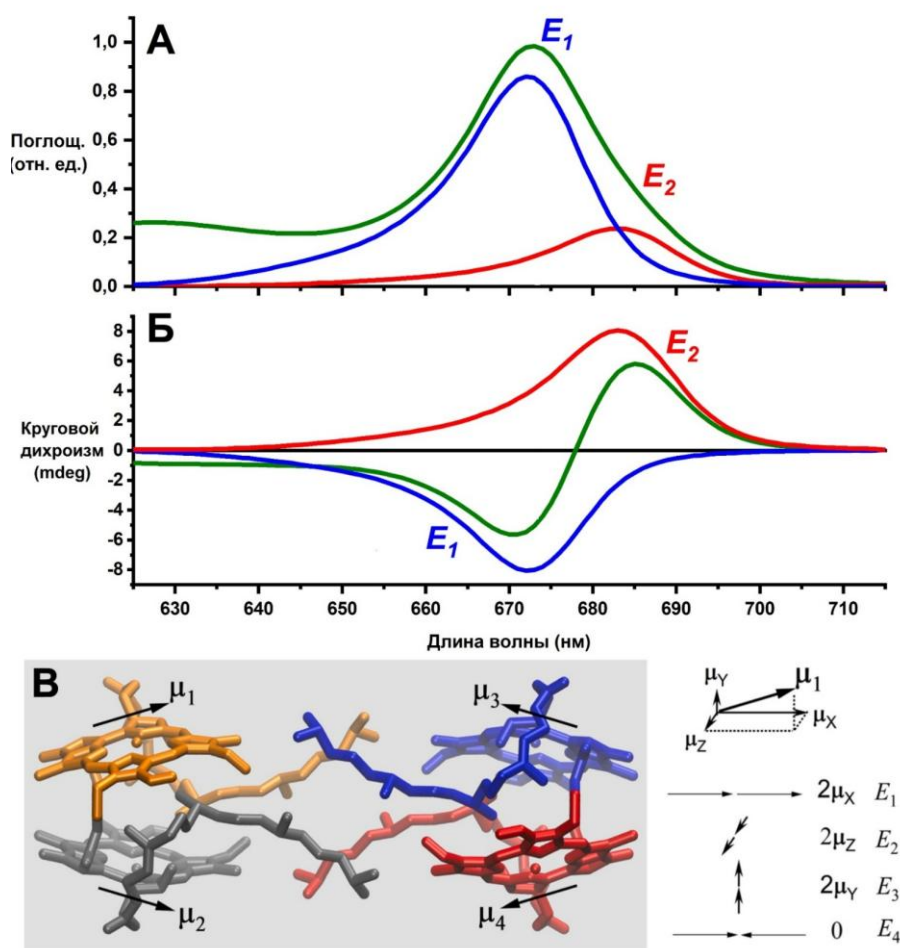


Рисунок 20. Спектр поглощения (А) и спектр кругового дихроизма (Б) препарата холоформы белка BoWSCP (зелёный), а также результат их разложения на две основные экситонные компоненты E_1 и E_2 (показаны красным и синим цветом). Выявленный при разложении гауссов компонент, отражающий вклад перехода $Q_y(1,0)$, не показан. (В) – Расположение молекул Хл в тетрамерном комплексе BoWSCP по данным рентгеновской кристаллографической структуры (PDB ID: 6S2Z), в которой Хл *b* заменен на Хл *a* [Agostini et al., 2017]. Проиллюстрировано направление векторов μ_k ($k = 1 - 4$) дипольных моментов $S_0 \rightarrow S_1$ перехода мономеров Хл, а также дипольных моментов четырех экситонных состояний E_n тетрамерного комплекса [Черепанов и др., 2023; Cherepanov et al., 2024].

Анализ переходных спектров поглощения позволяет получить базовые сведения о фотохимической активности холобелков WSCP. Переходные спектры поглощения BoWSCP (на

рисунке 21 обозначены как ТА (Transient Absorption spectra)), полученные при задержке 50 фс после возбуждения на длинах волн 430 нм и 670 нм, можно разложить на такие три отдельные компоненты, как спектр выцветания основного состояния (на рисунке 21 обозначен как GSB (Ground State Bleaching spectra), отрицательный вклад), спектр поглощения возбужденного состояния (на рисунке 21 обозначен как ESA (Excited State Absorption spectra), положительный вклад) и спектр выцветания в области стимулированного излучения (на рисунке 21 обозначен как BL (BLeaching in the stimulated emission region), отрицательный вклад). Данное разложение показывает, что стимулированное излучение в состоянии S_1 , полученном путём внутримолекулярной конверсии из состояния S_3 (возбуждение в пик $B_x \rightarrow S_3 \rightarrow S_1$), характеризуется примерно вдвое меньшей амплитудой (см. рисунок 21B) в сравнении со стимулированным излучением в равновесном состоянии S_1 , образующимся после возбуждения на 670 нм (возбуждение в пик $Q_y \rightarrow S_1$). Другими словами, если возбуждать в образце примерно одинаковое количество молекул холобелков BoWSCP в состояние S_3 и S_1 , то за время релаксации $S_3 \rightarrow S_1$ часть энергии (выраженной в количестве возбужденных молекул) теряется, и в состоянии S_1 в итоге оказывается меньшее число молекул, чем стоило ожидать. Данная потеря может возникать в результате сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана, которая конкурирует с реакцией внутримолекулярной конверсии [Черепанов и др., 2023]. Реакция фотовосстановления триптофана $Хл^* \rightarrow Хл^+ Trp^-$ ранее уже была зарегистрирована с малым квантовым выходом, но сделано это было при исследовании другого белка – LvWSCP, и с помощью другого метода – спектроскопии выжигания провалов при температуре 4 К в часовом временном интервале [Kell et al., 2016]. Обе эти реакции можно считать проявлением фотохимической активности белков WSCP, осуществляемой без участия АФК [Черепанов и др., 2023].

Стоит отметить, что фотовосстановление триптофана фиксировалось при облучении светом 430 нм, а фотохимические опыты, описанные в дальнейших главах данной работы, осуществляли при облучении светом с длинной волны 650 нм и более [Черепанов и др., 2023]. Однако в контексте данной диссертационной работы первостепенную ценность имеет сам факт возможности Хл в составе холобелка WSCP участвовать в фотохимической реакции со своим аминокислотным окружением.

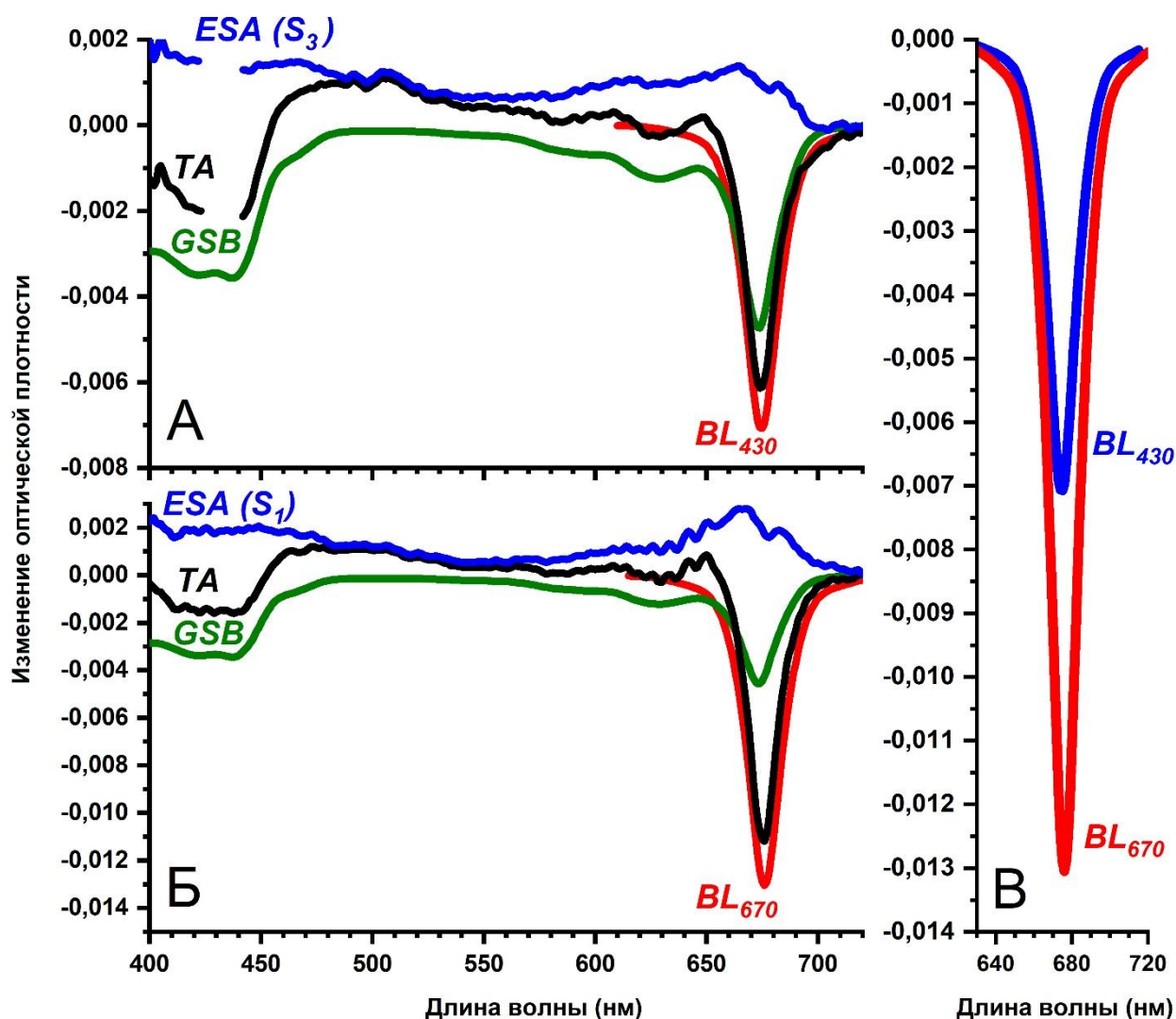


Рисунок 21. Результаты разложения переходных спектров поглощения BoWSCP (ТА, черный), полученных при задержке 50 фс после возбуждения светом 430 нм (А) и светом 670 нм (Б), на компоненты: спектр выцветания основного состояния (GSB, зелёный), спектр поглощения возбужденного состояния (ESA, синий) и спектр выцветания в области стимулированного излучения (BL, красный). (В) – сравнение спектров выцветания в области стимулированного излучения после возбуждения на длинах волн 430 нм (BL₄₃₀, синий) и 670 нм (BL₆₇₀, красный) [Черепанов и др., 2023].

3.3.2. Окислительно-восстановительные реакции с участием АФК и холобелков WSCP

Для проверки принципиальной возможности взаимодействия холобелков WSCP-II с донором электрона мы подвергли облучению красным светом смесь холобелков BoWSCP/LvWSCP и низкопотенциального донора электрона NADH. Изменение количества NADH оценивали по интенсивности поглощения данного вещества при 340 нм (рисунок 22). В

результате мы зафиксировали падение пика поглощения NADH при 340 нм на свету в присутствии холобелков BoWSCP/LvWSCP.

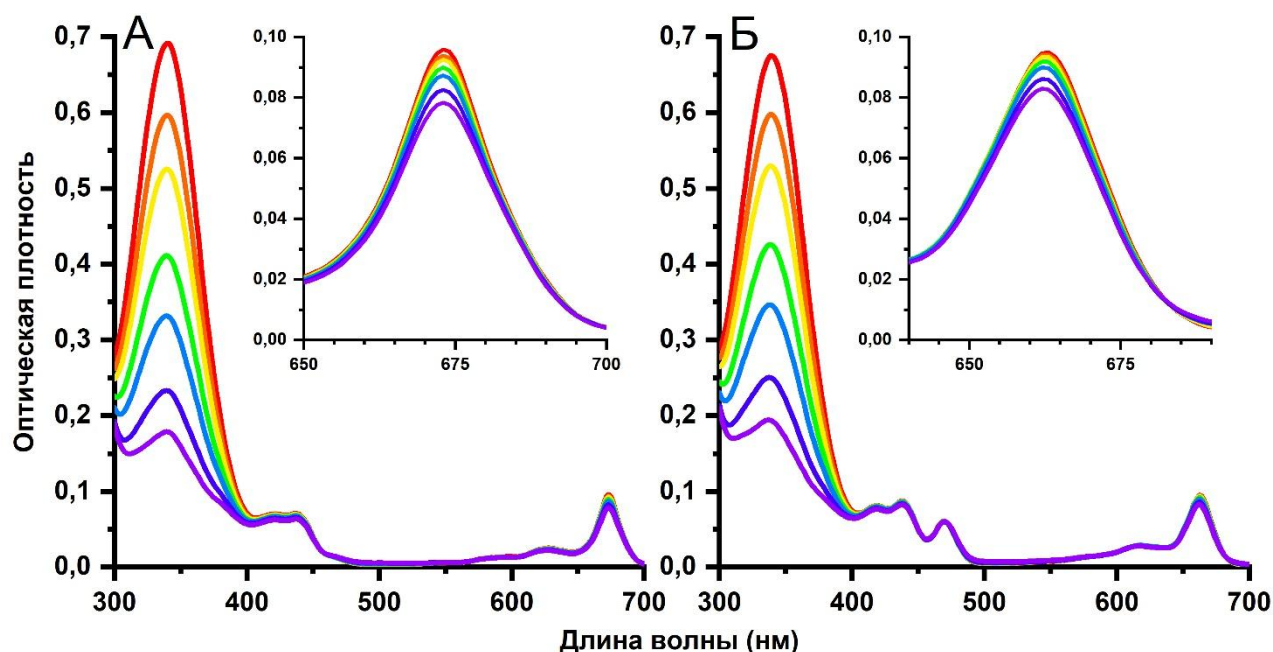


Рисунок 22. Спектр поглощения раствора холобелков BoWSCP (А) и LvWSCP (Б) с NADH до инкубации и спустя 1, 2, 4, 6, 10 и 14 минут инкубации на свету (от красного к фиолетовому). Во врезках показан пик поглощения комплексов BoWSCP/LvWSCP в красной области. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP/LvWSCP – до $OD_{673/663}=0,1$; NADH – 100 мкМ. Интенсивность красного света ($\lambda \geq 650$ нм) – $1800 \mu E \times m^{-2} \times c^{-1}$. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (pH 8,0). Атмосфера воздуха.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что холобелки BoWSCP/LvWSCP могут быть фотосенсибилизаторами окисления NADH. В случае замены холобелков BoWSCP/LvWSCP на соответствующие апобелки (не содержащие Хл), а также в случае отсутствия облучения светом реакции с NADH не происходило.

Ранее было установлено, что существует два типа реакций возбужденных светом молекул-сенсибилизаторов с другими молекулами. К реакциям первого типа относят такие реакции, в которых молекула-сенсибилизатор напрямую взаимодействует с другой молекулой, осуществляя передачу электрона или протона. К реакциям второго типа причисляют такие реакции, в которых молекула-сенсибилизатор взаимодействует не напрямую, а через промежуточное взаимодействие с молекулой кислорода либо передавая ей энергию возбуждения с образованием 1O_2 , либо осуществляя передачу электрона с образованием супероксидного анион-радикала [Foote, 1976]. Основываясь на данной классификации, можно предположить, что наблюдаемое в облучаемом светом растворе с холобелками WSCP-II окисление NADH может протекать либо

через непосредственное взаимодействие NADH с Хл в составе пигмент-белкового комплекса, либо через возможную генерацию холобелками АФК.

Скорость генерации АФК холобелками WSCP-II является дискуссионным вопросом в тематике фотохимических свойств белков WSCP. В течение долгого времени в литературе преобладало мнение о том, что связывание Хл белками WSCP подавляет генерацию АФК этим пигментом, вследствие чего данному белку приписывали защитную функцию при воздействии различных стрессовых факторов на клетки [Takahashi et al., 2012]. Однако в последнее время в литературе появились противоположные сведения, свидетельствующие об активной генерации данным белком $^1\text{O}_2$ и о предполагаемой на основе данного свойства функции холобелков WSCP как участников систем защиты растений от патогенов [Agostini et al., 2017].

В связи с вышесказанным, мы изучили влияние дефицита кислорода на фотосенсибилизированное холобелками BoWSCP/LvWSCP окисление NADH. Для этого в серии опытов с NADH и холобелками как BoWSCP/ LvWSCP экспериментальные пробы перед облучением и в ходе облучения светом продували инертным газом аргоном. Результаты данных опытов (рисунок 23) показали, что в инертной атмосфере аргона окисление NADH происходит лишь в первые минуты, а затем прекращается из-за, предположительно, окончательного израсходования остатков кислорода в смеси.

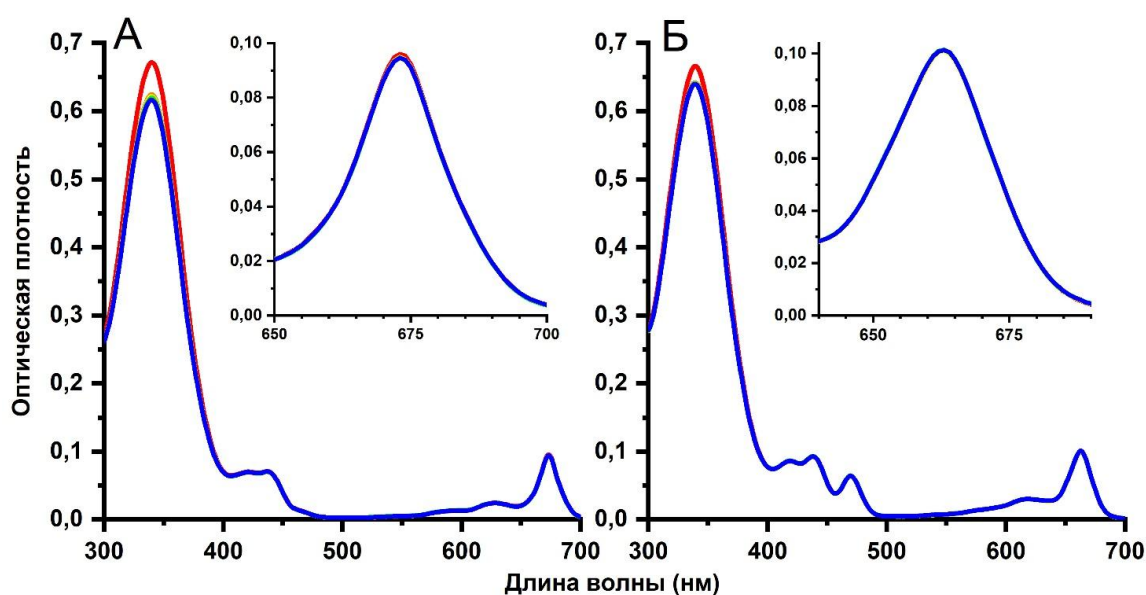


Рисунок 23. Спектр поглощения раствора холобелков BoWSCP (А) и LvWSCP (Б) с NADH до инкубации и спустя 1, 2, 4, 6 и 10 минут инкубации на свету (от красного к синему) с предварительной продувкой аргоном в течение 10 минут (ток газа не менее $8 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$, во время облучения продувка аргоном не прекращалась). Во врезках показан пик поглощения комплексов BoWSCP/LvWSCP в красной области. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP/LvWSCP – до $\text{OD}_{673/663}=0,1$; NADH – 100 мкМ. Интенсивность красного света ($\lambda \geq 650 \text{ нм}$) – $1800 \text{ мЕ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Буфер – Трис-НСl 10 мМ (рН 8,0).

На основании этих данных можно сделать вывод о том, что холобелки BoWSCP/LvWSCP окисляют NADH на свету лишь в присутствии кислорода. Следовательно, окисление NADH холобелками BoWSCP/LvWSCP происходит по механизму второго типа, связанному с генерацией АФК.

Чтобы выяснить, будут ли холобелки BoWSCP/LvWSCP в аналогичных условиях окислять другие доноры электрона, мы провели серию аналогичных опытов по облучению светом (ослабленным по сравнению с опытами по окислению NADH до $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) холобелков BoWSCP/LvWSCP и аскорбата. Опыты проводили как в присутствии кислорода воздуха, так и в инертной атмосфере аргона (10 минут предварительной продувки с током газа не менее $8 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ + продувка в процессе облучения). Для сравнения способности холобелков BoWSCP/LvWSCP к окислению NADH и аскорбата проводили вычитание из полученных спектров вкладов Хл-белковых комплексов BoWSCP/LvWSCP в оптическое поглощение образца, после чего рассчитывали процент падения оптической плотности в пике поглощения NADH (340 нм) и аскорбата (265 нм) от оптической плотности образца до инкубации. Полученные результаты приведены на рисунке 24.

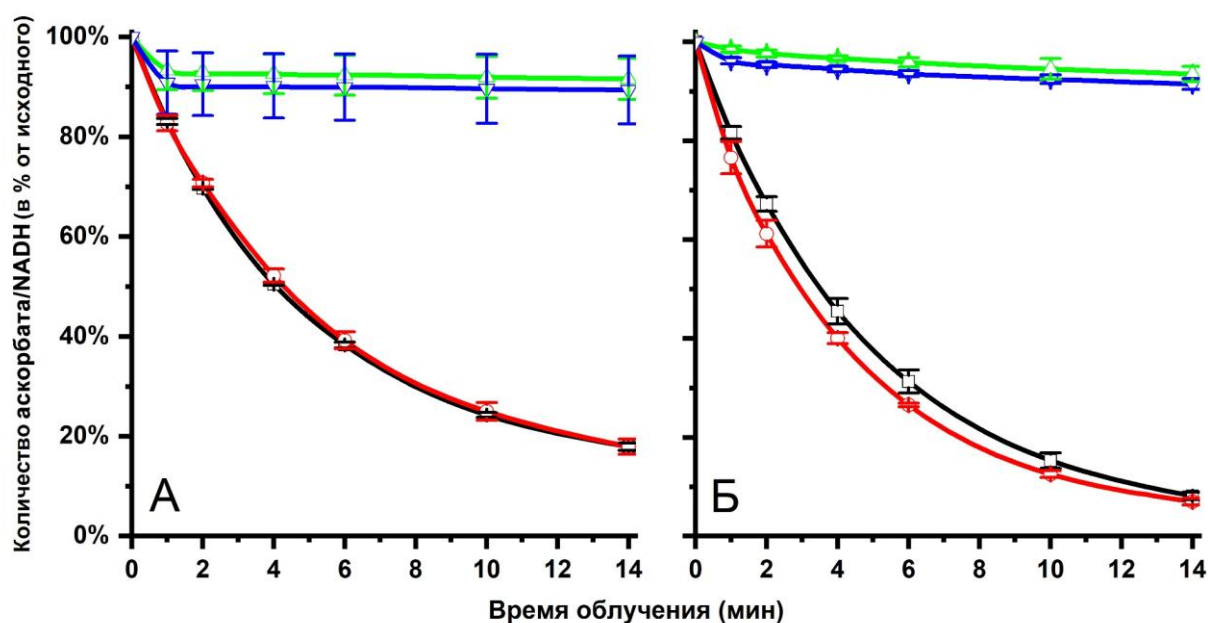


Рисунок 24. Зависимость оптической плотности NADH (А) и аскорбата (Б) от времени облучения красным светом $1800 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ (А) и $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ (Б) холобелками BoWSCP в присутствии кислорода (чёрный, ■), холобелками LvWSCP в присутствии кислорода (красный, ●), холобелками BoWSCP в атмосфере аргона (зеленый, ▲) и холобелками LvWSCP в атмосфере аргона (синий, ▼). Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP/LvWSCP – до $\text{OD}_{673/663}=0,1$; NADH/аскорбата – 100 мкМ. Буфер – Трис-НСl 10 мМ (рН 8,0). Опыты проводили либо в атмосфере воздуха, либо после предварительной продувки проб аргоном 10 минут (ток газа не менее $8 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$; во время облучения продувка аргоном не прекращалась).

Согласно результатам, холобелки BoWSCP и LvWSCP имели почти одинаковую скорость фотосенсибилизированного окисления NADH, а также не имели значительной разницы в скорости фотосенсибилизированного окисления аскорбата. Окисление аскорбата, как и окисление NADH, происходило лишь в присутствии кислорода воздуха и почти не происходило при продувке проб аргоном.

Чтобы выяснить, насколько различны скорости окисления аскорбата и NADH холобелками BoWSCP при прочих равных условиях, мы сравнили динамики окисления данных веществ холобелками BoWSCP при облучении светом одинаковой ослабленной интенсивности ($700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$). Расчёт процента падения концентрации NADH и аскорбата выполнялся также, как и в предыдущих опытах, с вычетом вклада BoWSCP из спектров поглощения. Полученные значения приведены в виде графика на рисунке 25.

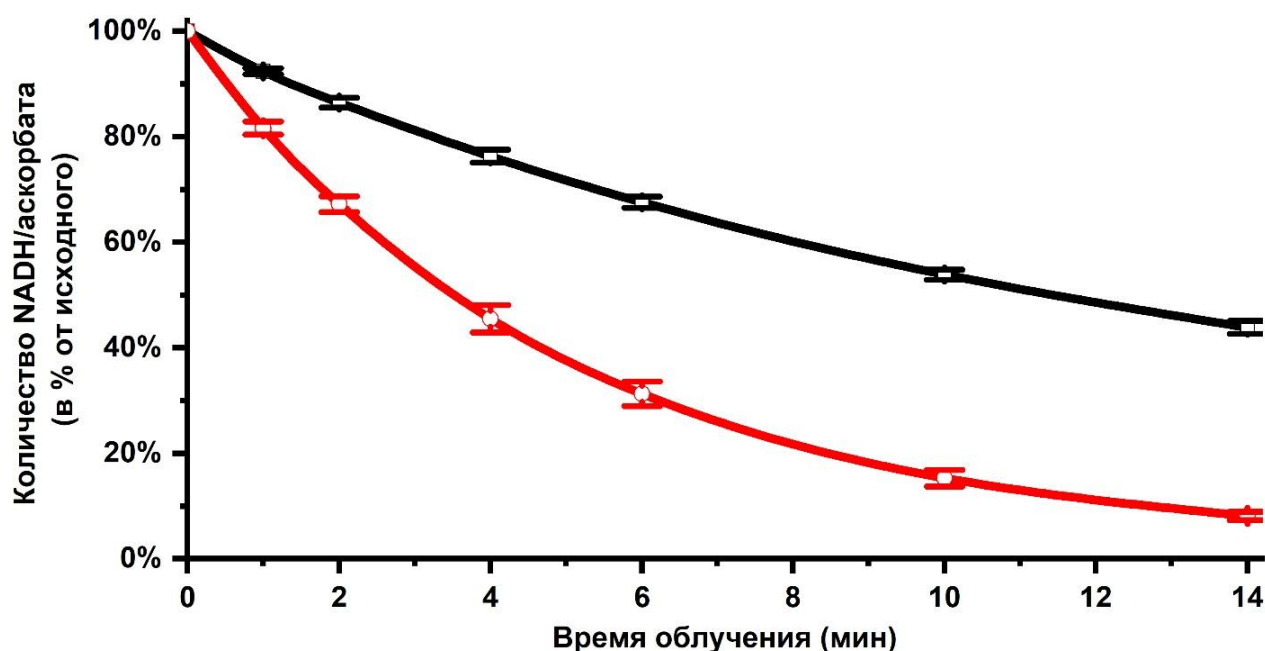


Рисунок 25. Зависимость оптической плотности NADH (чёрный, ■) и аскорбата (красный, ●) от времени инкубации на свету с Хл-белковыми комплексами BoWSCP в присутствии кислорода. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до $\text{OD}_{673}=0,1$; NADH/аскорбата – 100 мкМ. Интенсивность красного света – $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Буфер – Трис-НСl 10 мМ (рН 8,0).

Согласно результатам (рисунок 25), окисление аскорбата происходило примерно в 2,4 раза быстрее, чем окисление NADH. Это близко к разнице в 1,9 раза между константами тушения молекул $^1\text{O}_2$ для аскорбата ($4 \pm 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) и для NADH ($2,1 \pm 0,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) [Егоров, 2007].

Таким образом, полученные нами данные полностью согласуются с предполагаемым механизмом фотосенсибилизированного окисления NADH и аскорбата, вызванным генерацией

$^1\text{O}_2$. Аскорбат окисляется быстрее, чем NADH, холобелками WSCP по причине того, что он взаимодействует с молекулами $^1\text{O}_2$ более активно, чем NADH.

Чтобы выяснить, действительно ли молекулы NADH и аскорбата окисляются холобелками WSCP с помощью $^1\text{O}_2$, мы провели серию опытов по окислению NADH и аскорбата холобелками BoWSCP в присутствии азиды натрия (NaN_3) - тушителя $^1\text{O}_2$. Полученные в результате опытов скорости окисления NADH и аскорбата сравнивали с аналогичной скоростью, полученной в опытах без добавления азиды натрия. Результаты представлены на рисунке 26.

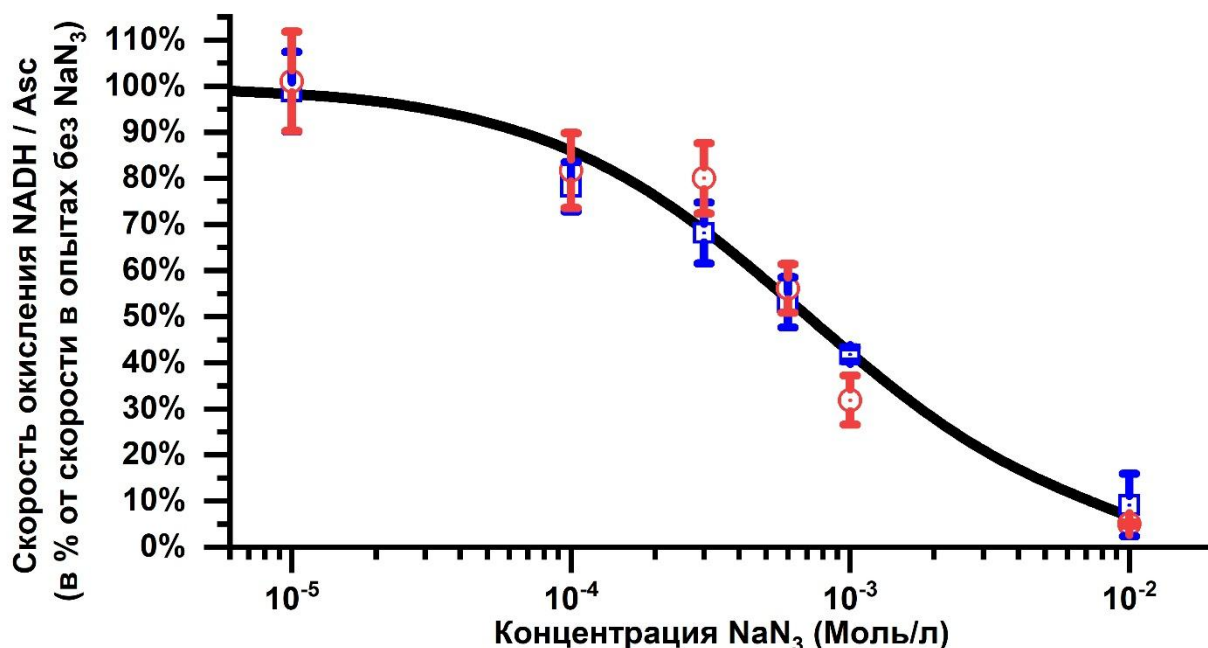


Рисунок 26. Зависимость уменьшения скорости окисления NADH (красный, ●) и аскорбата (синий, ■) комплексами BoWSCP (за 1-ю минуту облучения красным светом) от концентрации азиды натрия в растворе (диапазон 0,01-10 мМ). Черной линией показана зависимость уменьшения времени жизни $^1\text{O}_2$ (в % от времени жизни в отсутствие тушителей) от концентрации азиды натрия, рассчитанная по уравнению Штерна-Фольмера (см. «Материалы и методы»). Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до $\text{OD}_{673}=0,1$; NADH и аскорбата – 100 мкМ. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (pH 8,0). Опыты проводили в атмосфере воздуха.

Согласно результатам (рисунок 26), скорости окисления NADH и аскорбата равномерно падали при добавлении азиды натрия, что согласуется с его ролью тушителя $^1\text{O}_2$. Более того, степень уменьшения скоростей окисления в присутствии NaN_3 , выраженная в процентах от скорости без азиды, примерно совпадала с рассчитанным по уравнению Штерна-Фольмера уменьшением времени жизни молекулы $^1\text{O}_2$, также выраженным в % от времени жизни в отсутствие NaN_3 . Оба эти наблюдения подтверждают гипотезу о том, что фотоокисление NADH и аскорбата холобелками BoWSCP осуществляется посредством генерации последними $^1\text{O}_2$.

KI, известный тушитель возбужденных состояний Хл, в концентрации 100 мМ не снижал флуоресценцию препарата холобелка BoWSCP и, в отличие от NaN₃, в концентрации 1 мМ не влиял на скорость окисления NADH. Однако при более высоких концентрациях KI, в противоположность NaN₃, ускорял скорость окисления NADH, после исчерпания которого в пробе образовывался новый компонент, по разностному спектру поглощения идентифицированный как I₃⁻ (рисунок 27). При продувке пробы аргоном появление в ней I₃⁻ не наблюдали. Окисление I⁻ до I₃⁻, согласно данным литературы, может происходить при взаимодействии с ¹O₂ [Wilkinson et al., 1995], генератором которого, как мы убедились, являются холобелки WSCP.

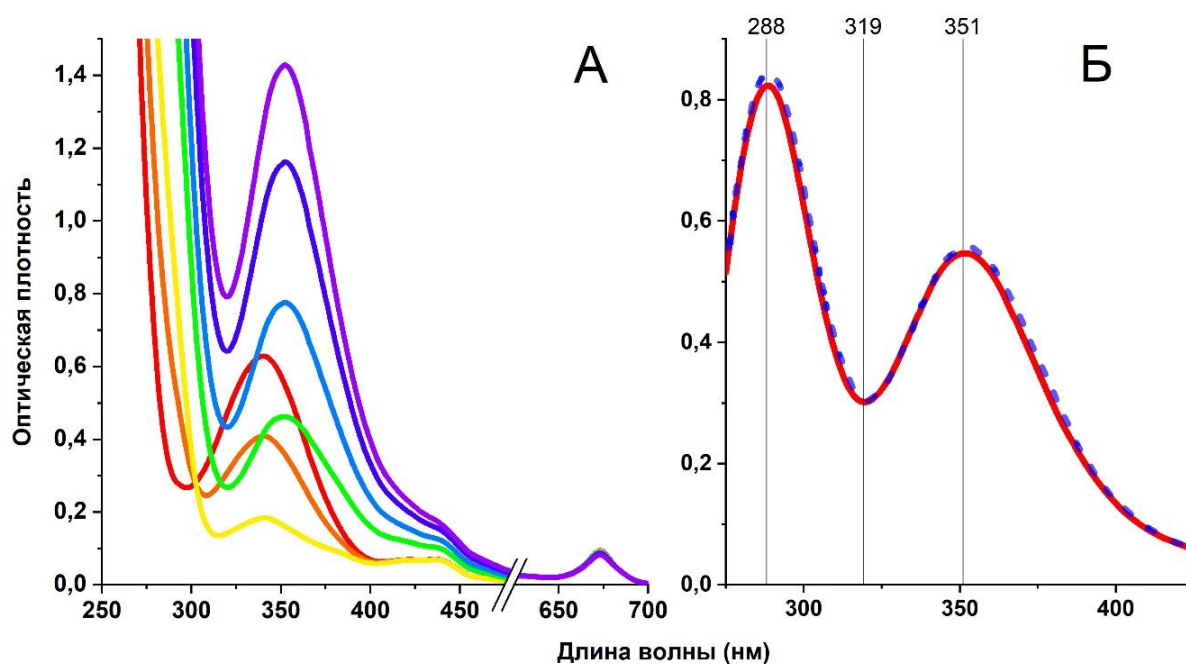


Рисунок 27. (А) Спектр поглощения раствора холобелков BoWSCP со 100 мкМ NADH и 100 мМ KI до инкубации и спустя 1, 2, 4, 6, 10 и 14 минут инкубации на свету (от красного к фиолетовому). (Б) Разностный спектр поглощения раствора Хл-белковых комплексов BoWSCP со 100 мМ KI до инкубации и спустя 1 минуту инкубации на свету (красная сплошная линия), а также нормированный спектр поглощения I₃⁻ в водном растворе (синяя пунктирная линия) [Kireev et al., 2015]. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до OD₆₇₃=0,1. Интенсивность красного света ($\lambda \geq 650$ нм) – 1800 $\mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (pH 8,0). Атмосфера воздуха.

Таким образом, можно сделать вывод, что при высоких концентрациях (10-100 мМ) ионы I⁻ могут взаимодействовать с образованными холобелками WSCP на свету молекулами ¹O₂. Данное взаимодействие имеет сходство с механизмом окисления NADH и аскорбата холобелками WSCP и своим сходством дополнительно подтверждает его.

Во всех далее описанных опытах с цитохромом *c* мы стремились достигнуть в реакционной смеси $OD = 0,2$ в пике поглощения холобелков BoWSCP и LvWSCP при 663/673 нм, что соответствует конечной концентрации Хл-белковых комплексов около 0,7 мкМ ($60 \text{ мкг} \times \text{мл}^{-1}$). Также во всех опытах в реакционную смесь добавляли 150 мМ NaCl для подавления пенообразования в случае продувки смеси аргоном.

Для проверки принципиальной возможности взаимодействия холобелков WSCP-II с внешним акцептором электрона мы инкубировали смесь холобелков BoWSCP или LvWSCP с окисленной формой цитохрома *c* из лошадиного сердца при облучении светом. Степень восстановления цитохрома *c* анализировали по повышению оптической плотности при длине волны 550 нм (согласно разделу «Материалы и методы»). На спектрах, полученных в результате опытов с холобелками BoWSCP (рисунок 28), наблюдали увеличение пика восстановленной формы цитохрома *c* (550 нм) при параллельном падении пика поглощения Хл-белковых комплексов в области 660-680 нм, что говорит о фотохимическом взаимодействии данных белков. Аналогичные результаты были получены и в опытах с LvWSCP. Также провели контрольный опыт по инкубации смеси WSCP-II - цитохром *c* без облучения красным светом – в условиях темноты восстановление цитохрома *c* было отчётливо медленнее, чем в условиях облучения. Инкубация цитохрома *c* без Хл-белковых комплексов WSCP-II при облучении красным светом не приводила к каким-либо изменениям спектра поглощения цитохрома *c*.

Для получения кинетики восстановления цитохрома *c*, обусловленного именно фотохимической активностью холобелков BoWSCP/LvWSCP, проводили вычитание из спектров поглощения вклада реакционной смеси Хл-белковых комплексов WSCP-II и цитохрома *c* до облучения, а из полученной кинетики изменения оптической плотности при 550 нм в условиях облучения светом вычитали аналогичную кинетику без облучения (темновой контроль), чтобы выявить чистый вклад облучения светом. Полученные результаты приведены на рисунке 29.

Согласно результатам расчетов, холобелки BoWSCP и LvWSCP восстанавливают цитохром *c* значительно активнее при облучении красным светом, чем без облучения (рисунок 29), что говорит о принципиальной способности холобелков BoWSCP и LvWSCP к фотохимическому взаимодействию с цитохромом *c*. Значимых различий в скорости восстановления цитохрома *c* между холобелками BoWSCP и LvWSCP обнаружено не было.

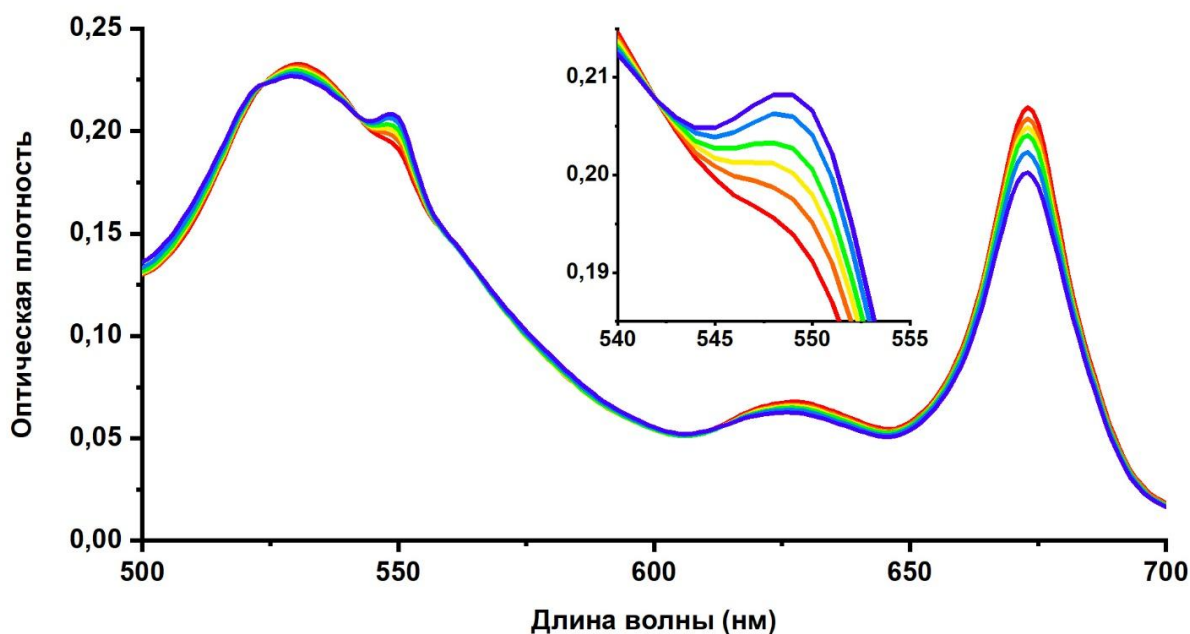


Рисунок 28. Спектр поглощения смеси холобелков BoWSCP и цитохрома с до облучения и спустя 2, 4, 6, 10 и 15 минут облучения красным светом (градиент от красного к фиолетовому). На врезке показаны изменения пика поглощения восстановленной формы цитохрома с при 550 нм. Дополнительные параметры опыта: Концентрация BoWSCP – до $OD_{673}=0,2$; цитохрома с – 20 мкМ; NaCl – 150 мМ. Интенсивность облучения красным светом ($\lambda \geq 650$ нм) – $1800 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (pH 8,0).

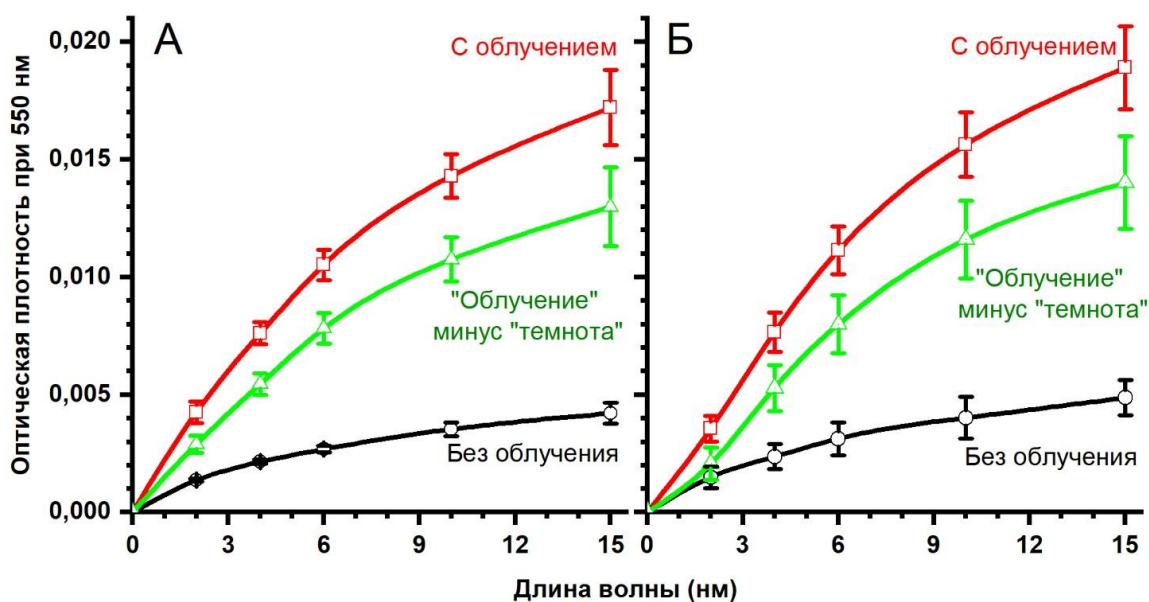


Рисунок 29. Кинетика изменения оптической плотности в полосе 550 нм смеси цитохрома с с холобелками BoWSCP (А) и LvWSCP (Б) ($OD_{673/663}=0,2$) при облучении красным светом (красная линия, ■), в ходе контрольного опыта без облучения светом, (черная линия, ●), а также разность между ними (зелёная линия, ▲). Условия опытов аналогичны данным в рисунке 28.

Нельзя не отметить, что во всех проведенных опытах (помимо комплексов WSCP-II, цитохрома *c*, NaCl и Трис-буфера) в пробах присутствовал кислород воздуха. Чтобы выяснить, является ли кислород воздуха необходимым участником реакции, мы проводили опыты по совместному облучению красным светом холобелков BoWSCP и цитохрома *c* после предварительной усиленной (токи газа 18 и 90 мл×мин⁻¹) продувки аргоном в течение 14 минут (см. раздел «Материалы и методы»). Полученные результаты сравнивали с данными аналогичных опытов без продувки аргоном. Результаты приведены на рисунке 30.

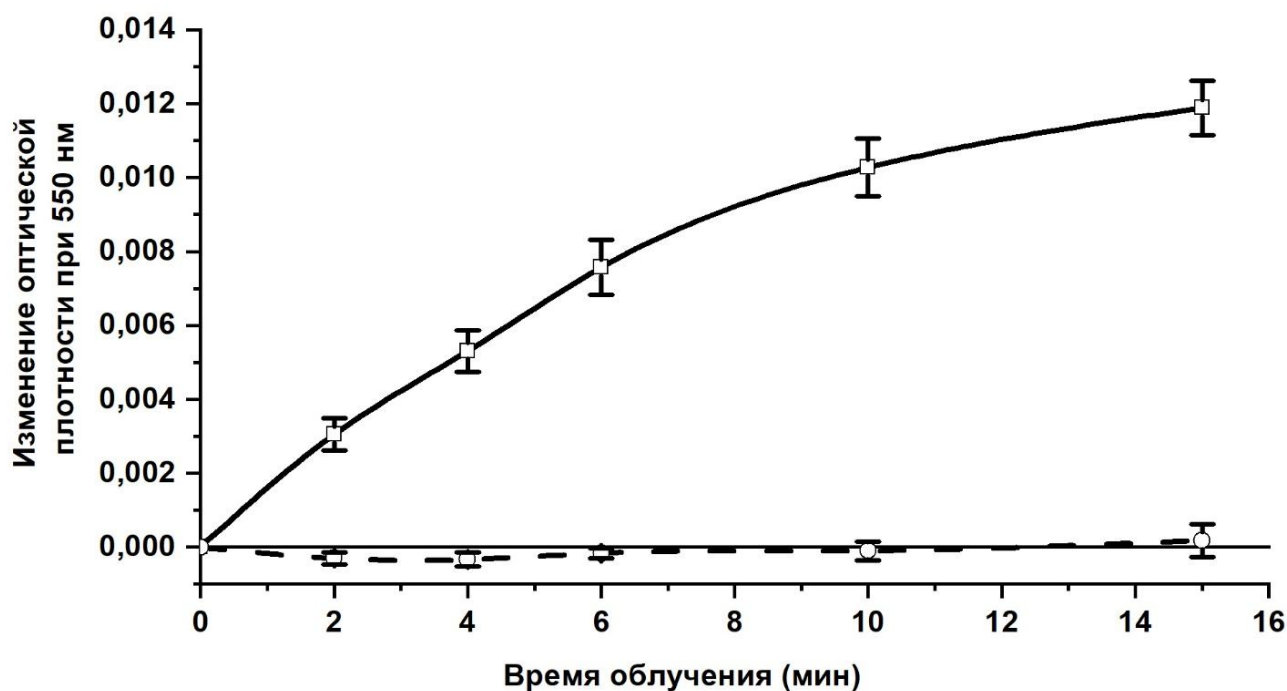


Рисунок 30. Кинетика изменения оптической плотности при 550 нм смеси цитохрома *c* с холобелками BoWSCP при облучении светом в атмосфере кислорода воздуха (сплошная линия, ■), а также в условиях интенсивной продувки аргоном (18 и 90 мл×мин⁻¹) в течение 14 минут (пунктирная линия, ●). Вычтен вклад восстановления цитохрома *c* в смеси без освещения. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до OD₆₇₃=0,2; цитохрома *c* – 20 мкМ; NaCl – 150 мМ. Измерения проводили спустя 2, 4, 6, 10 и 15 минут облучения красным светом интенсивностью 1800 мкЕ×м⁻²×с⁻¹. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (рН 8,0).

Результаты опытов показывают, что интенсивная предварительная продувка проб аргоном, вытесняющим кислород из раствора, полностью предотвращает восстановление цитохрома *c*, что говорит о необходимости присутствия кислорода для фотохимического восстановления цитохрома *c* холобелками WSCP-II.

Согласно данным литературы [Butler et al., 1975; Koppenol et al., 1976; Butler et al., 1982], цитохром *c* может быть восстановлен при взаимодействии с супероксидным анион-радикалом (далее O₂^{*-}) – одной из разновидностей АФК, и данное восстановление ингибируется

присутствием ионов меди в растворе [Butler et al., 1982]. Чтобы проверить, осуществляется ли подобное ингибирование в случае фотохимической реакции холобелков BoWSCP с цитохромом *c*, мы осуществили серию опытов, подобных описанным ранее, в которых варьировали концентрацию хлорида меди (II) от 0 до 100 мкМ. Результаты приведены на рисунке 31.

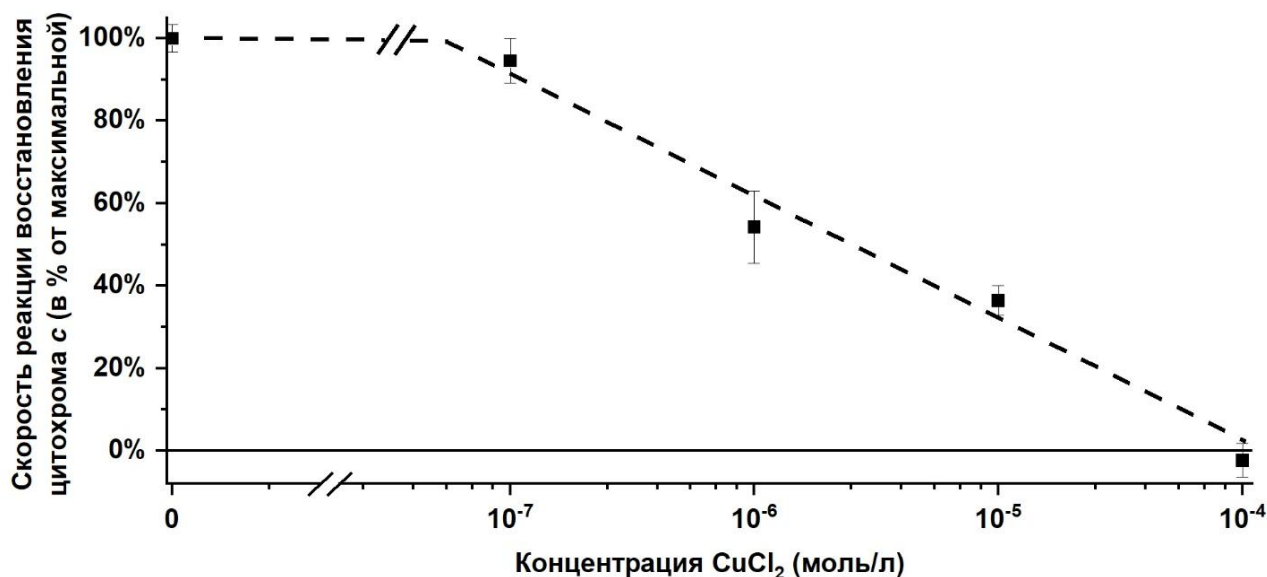


Рисунок 31. Зависимость скорости восстановления цитохрома *c* в смеси с холобелками BoWSCP от концентрации ионов Cu^{2+} . Вычет вклада восстановления цитохрома *c* в смеси без освещения не проводили. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP — до $\text{OD}_{673}=0,2$; цитохрома *c* — 10 мкМ; NaCl — 150 мМ; CuCl_2 от 0 до 100 мкМ. Измерения проводили спустя 2 минуты облучения красным светом интенсивностью $1800 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Буфер — Трис-НС1 10 мМ (pH 8,0). Атмосфера воздуха.

Результаты опытов показывают, что ионы меди (в концентрации 100 нМ и больше) уменьшают скорость фотовосстановления цитохрома *c* холобелками WSCP-II. При концентрации CuCl_2 100 мкМ и более вместо восстановления цитохрома *c* происходит окисление имеющейся изначально примеси его восстановленной формы. Это является косвенным доказательством того, что фотовосстановление цитохрома *c* холобелками WSCP-II не является прямым процессом, а медиатором данного процесса выступает O_2^{*-} .

Чтобы удостовериться в участии O_2^{*-} в фотовосстановлении цитохрома *c* холобелками WSCP-II, мы провели опыты, подобные описанным ранее, но в реакционную смесь (помимо BoWSCP, цитохрома *c* и NaCl) добавляли ферменты супероксиддисмутазу (преобразующую O_2^{*-} в пероксид водорода и кислород) и каталазу (утилизирующую пероксид водорода, которая является ингибитором супероксиддисмутазы [Hodgson et al., 1975]). Ферменты были добавлены в заведомо избыточном количестве (в расчётной активности не менее 136,5 и 250 единиц на

миллилитр пробы) для того, чтобы обеспечить максимально быстрое разрушение O_2^{*-} в пробе. Результаты приведены на рисунке 32.

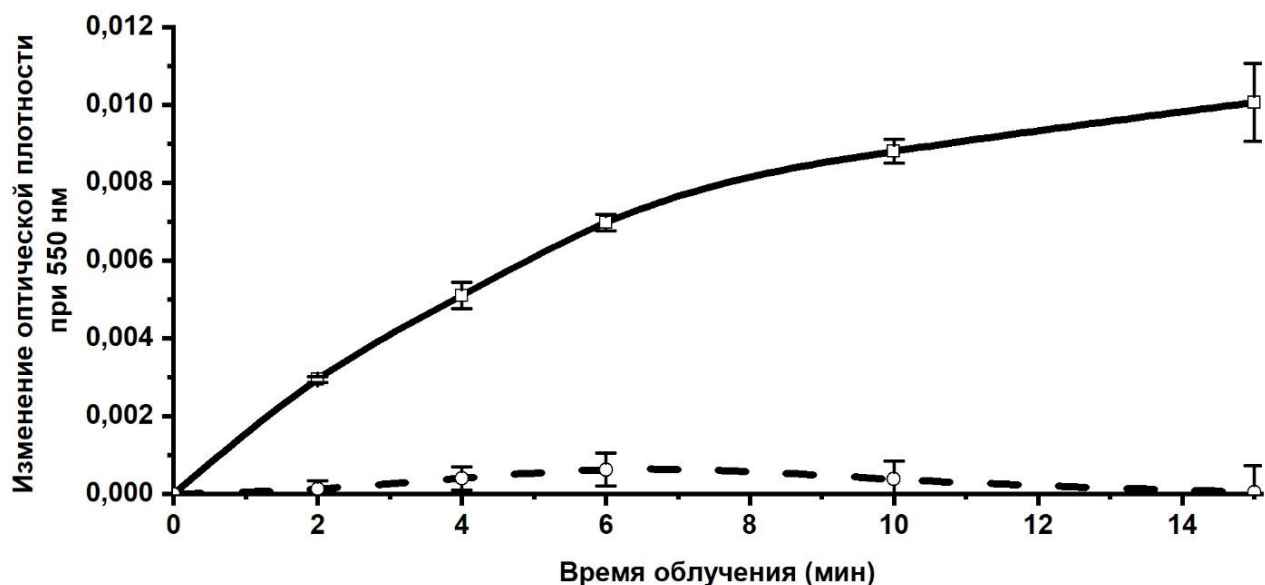


Рисунок 32. Кинетика изменения оптической плотности в полосе 550 нм смеси цитохрома *c* и Хл-белковых комплексов BoWSCP без добавления (сплошная линия, ■) и с добавлением (пунктирная линия, ●) 1 мкМ супероксиддисмутазы и 0,1 мкМ каталазы. Вычтено восстановление цитохрома *c* в смеси без освещения. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до $OD_{673}=0,2$; цитохрома *c* – 10 мкМ; NaCl – 150 мМ; супероксиддисмутаза – 1 мкМ (136,5 U/мл); каталаза 0,1 мкМ (250 U/мл). Измерения проводили спустя 2, 4, 6, 10 и 15 минут облучения красным светом интенсивностью $1800 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$. Буфер – Трис-HCl 10 мМ (pH 8,0). Атмосфера воздуха.

Результаты опытов показывают, что добавление супероксиддисмутазы и каталазы в заведомо избыточных концентрациях почти полностью ингибирует процесс фотовосстановления цитохрома *c* холобелками BoWSCP в атмосфере воздуха и уменьшает скорость восстановления цитохрома *c* до уровня аналогичного контрольного опыта в условиях темноты.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что холобелки WSCP-II способны к фотовосстановлению цитохрома *c*. Фотовосстановление цитохрома *c* происходит через его взаимодействие с O_2^{*-} , образующимся при облучении светом холобелков WSCP-II.

3.4. Исследование устойчивости холобелков BoWSCP и LvWSCP к изменению значения температуры, pH, а также к участию в фотохимических реакциях

Из данных литературы известно, что образованные по механизму второго типа АФК могут оказывать негативное влияние на структуру самих молекул – сенсibilизаторов их появления. Чтобы проанализировать устойчивость холобелков BoWSCP и димеров Хл в его составе в ходе

фотохимических реакций, включающих генерацию АФК, мы проконтролировали нативность структуры данных холобелков по их спектрам поглощения и спектрам кругового дихроизма до и после световой экспозиции (рисунок 33).

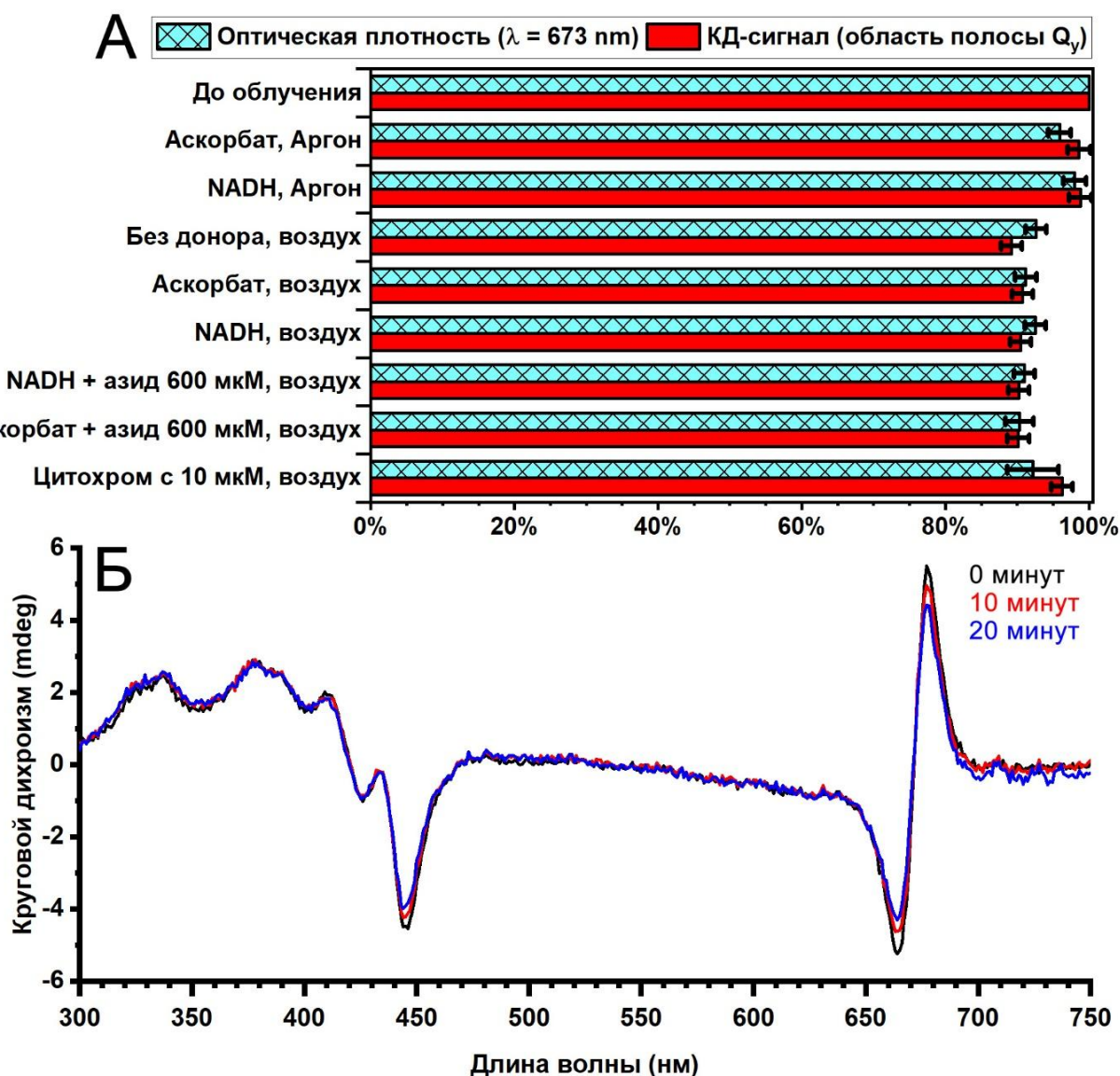


Рисунок 33. (А) – Величина падения пика поглощения Хл при 673 нм в холобелках BoWSCP (синие столбцы со штриховкой) и величина падения амплитуды пиков в диапазоне 600-750 нм на спектрах кругового дихроизма (красные столбцы без штриховки) после облучения светом $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ 10 минут. (Б) – Спектры кругового дихроизма холобелков BoWSCP до облучения и после облучения красным светом интенсивностью $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Дополнительные параметры опытов: Концентрация BoWSCP – до $\text{OD}_{673}=0,2$; Буфер – Трис-HCl 10 мМ (рН 8,0).

Полученные данные (рисунок 33) демонстрируют, что скорость разрушения структуры димера Хл в составе холобелков BoWSCP примерно совпадает со скоростью деградации самого Хл в составе данных холобелков. Наибольшее влияние на скорость фотодеградаци Хл имел такой параметр, как наличие или отсутствие кислорода воздуха в смеси. На основании этого

можно сделать вывод, что в фотохимических реакциях с донорами электрона не происходит дополнительного искажения структуры холобелков BoWSCP, ведущего к разрушению димера Хл без разрушения самого пигмента. Поскольку процент деградировавшего Хл не превышал 10-15%, можно считать, что белки BoWSCP проявляют устойчивость в ходе фотосенсибилизации ими фотохимических реакций с донорами электрона. Результаты аналогичного мониторинга структуры холобелков BoWSCP в опытах с цитохромом с также указывают, что скорость разрушения структуры димера Хл в составе холобелков BoWSCP, о которой судили по амплитуде пиков на спектрах кругового дихроизма при 600-750 нм, примерно совпадает со скоростью деградации самого Хл в данных холобелках.

На основании этого можно сделать вывод, что в фотохимических реакциях с цитохромом с, NADH и аскорбатом не происходит дополнительного искажения структуры холобелков BoWSCP, ведущего к разрушению димера Хл без разрушения самого пигмента. Сам процесс фотодегградации Хл внутри холобелков WSCP-II является кислород-зависимым.

Согласно данным литературы, комплексы белков WSCP-II с Хл очень термостабильны и не распадаются даже при кипячении [Kamimura et al., 1997, Schmidt et al., 2003; Bektas et al., 2012], однако не было данных об устойчивости оптических свойств холобелков WSCP при изменении температуры. Чтобы узнать, как сильно изменяются оптические свойства холобелков BoWSCP и LvWSCP при изменении температуры, мы провели измерение спектров поглощения препаратов вышеперечисленных холобелков в температурном диапазоне от 15 до 70 °С в термостатируемом кюветном отделении спектрофотометра. Результаты приведены на рисунке 34.

Спектры поглощения холобелков BoWSCP и LvWSCP при изменении температуры от 15 до 70 °С претерпевают лишь небольшие различия, которые связаны, предположительно, с «уширением» пиков поглощения Хл из-за увеличения кинетической энергии молекул, а также с незначительной деградацией холобелков в ходе опыта вследствие продолжительного (пятичасового) нагрева.

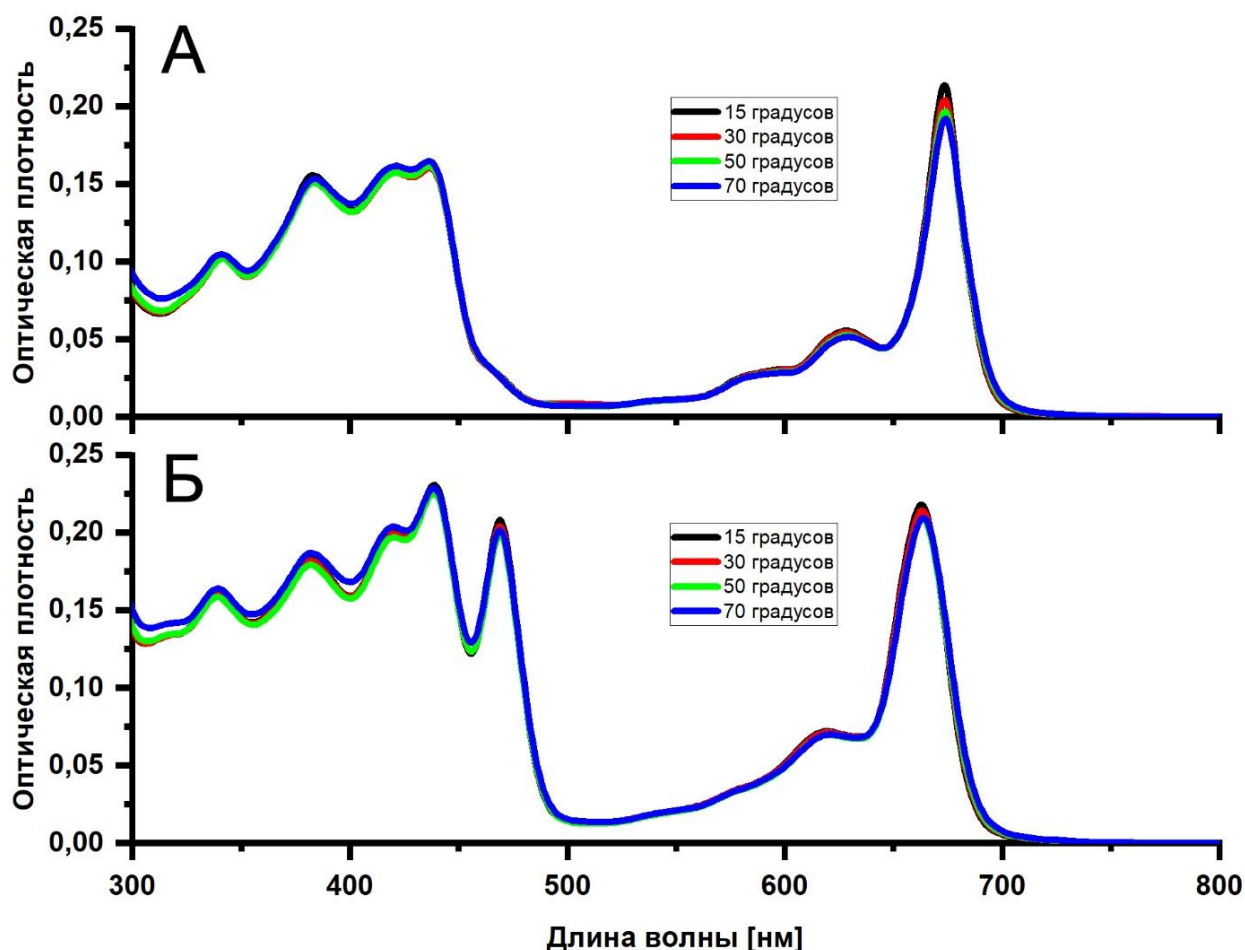


Рисунок 34. Спектры поглощения холобелков BoWSCP (А) и LvWSCP (Б) при температуре 15 (черный), 30 (красный), 50 (зеленый) и 70 (синий) градусов Цельсия. Коррекцию спектров поглощения на величину возможной деградации холобелков от продолжительного нагрева не проводили.

Чтобы проанализировать, обладают ли полученные нами препараты холобелков BoWSCP и LvWSCP устойчивостью к низкому и высокому значению pH и как сильно изменяются при этом их оптические свойства, мы провели измерение спектров поглощения препаратов вышеперечисленных холобелков в буферном растворе, pH которого варьировали от 3 до 11. Результаты приведены на рисунке 35.

Спектры поглощения холобелков BoWSCP и LvWSCP в диапазоне pH от 3 до 11 изменяются незначительно. Наблюдаемые незначительные изменения, по-видимому, вызваны небольшим конформационным сдвигом структуры белка в ответ на протонирование заряженных групп при низком pH и неспецифическим увеличением рассеяния при понижении pH [Cherepanov et al., 2024].

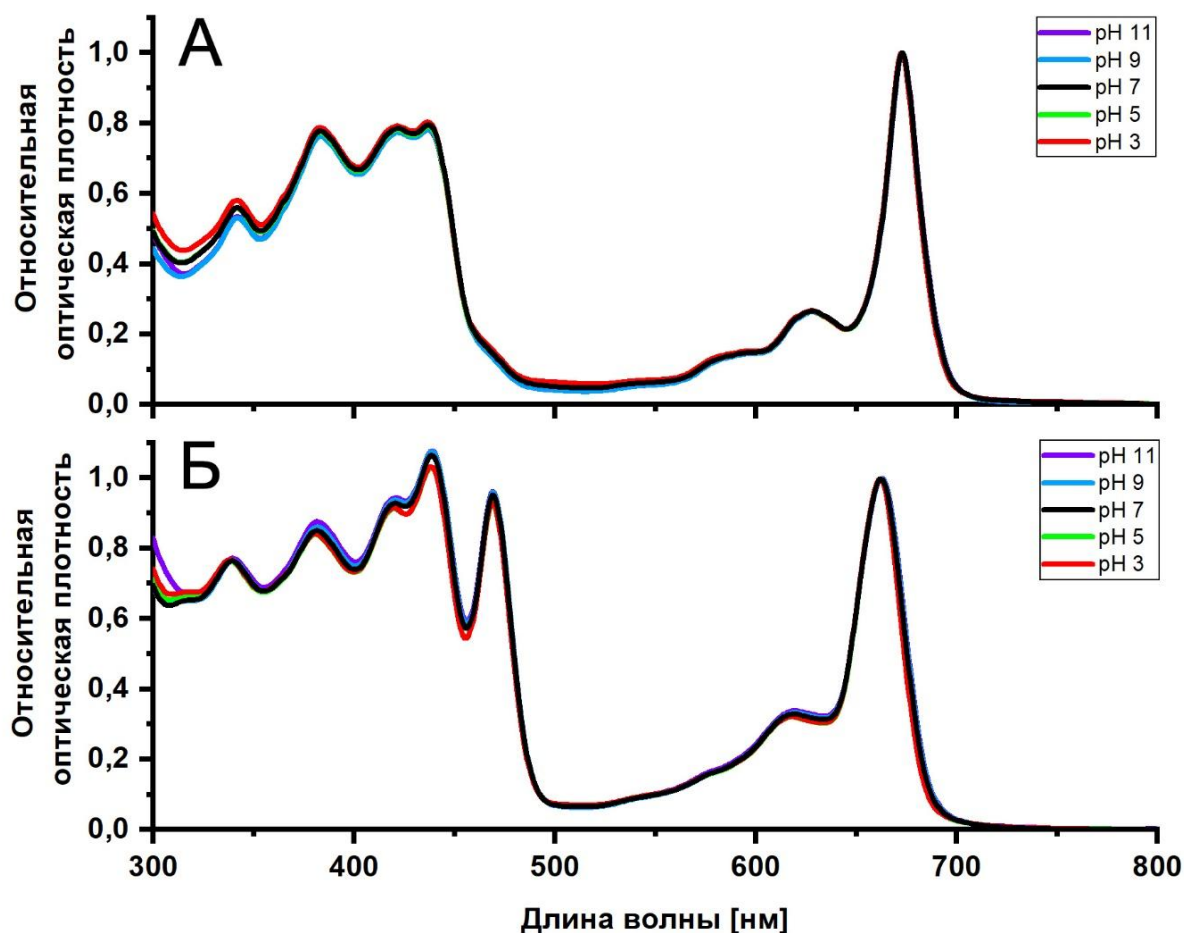


Рисунок 35. Спектры поглощения холобелков BoWSCP (А) и LvWSCP (Б) при значении рН раствора 3 (красный), 5 (зеленый), 7 (чёрный), 9 (синий) и 11 (фиолетовый). Спектры нормировали в пике 600-700 нм до величины оптической плотности 1 для коррекции разбавления препарата.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что спектр поглощения холобелков BoWSCP не изменяется при варьировании температуры от 15 до 70 °С, а также при варьировании значений рН раствора от 3 до 11. Подобная устойчивость оптических свойств холобелков WSCP является положительным их качеством с точки зрения возможного биотехнологического применения и позволяет ожидать, что способность их сенсibilизировать фотохимические реакции также не будет снижаться в вышеописанных условиях.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Краткое перечисление полученных результатов. Обсуждение связи спектральных свойств белков WSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени с их способностью генерировать АФК

Результаты данного исследования Хл-связывающих белков WSCP-II кратко можно перечислить в виде пяти пунктов:

- 1) Совместный анализ препаратов холобелка BoWSCP методами абсорбционной спектроскопии при комнатной температуре, спектроскопии кругового дихроизма в видимой области при комнатной температуре, а также методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии типа «возбуждение-зондирование» выявил, что энергия возбуждения состояния S_1 , распределенная между двумя экситонно-связанными молекулами Хл после наступления теплового равновесия, сосредоточена с преобладающей долей в 79% в высокоэнергетическом экситонном состоянии E_1 (672 нм) и лишь на 21% – в низкоэнергетическом экситонном состоянии E_2 (684 нм).
- 2) Анализ переходных спектров поглощения холобелков BoWSCP, полученных методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии типа «возбуждение-зондирование», показал, что часть световой энергии, переданная молекулам путём возбуждения в состояние S_3 светом 430 нм, теряется за время дальнейшей релаксации $S_3 \rightarrow S_1$, что может быть проявлением конкурирующей с реакцией внутримолекулярной конверсии сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана.
- 3) Результаты совместного (в смеси) облучения красным светом холобелков WSCP-II и таких веществ, как NADH и аскорбат, демонстрируют окисление данных веществ через механизм образования в растворе 1O_2 .
- 4) Результаты совместного (в смеси) облучения красным светом холобелков WSCP и цитохрома *c* демонстрируют восстановление последнего через механизм образования в растворе O_2^{*-} .
- 5) Хл и его димерная структура в составе холобелков WSCP-II устойчивы к длительному воздействию света и осуществлению фотохимических реакций, опосредованных генерацией АФК. Спектры поглощения холобелков WSCP-II устойчивы к изменению температуры вплоть до 70 °С, а также к варьированию pH раствора в пределах значений 3 – 11.

Из перечисленных выше результатов последние три непосредственно связаны с демонстрацией фотохимической активности белков WSCP-II по отношению к экзогенным,

находящимся в растворе молекулам (NADH, аскорбат, цитохром с). Первые два результата из перечисленных выше относятся скорее к спектральным свойствам холобелков WSCP и напрямую не приводят к каким-либо выводам об их фотохимической активности, однако их обсуждение важно для понимания данной активности.

Так, продемонстрированный нами факт, что в возбужденном димере Хл внутри холобелков BoWSCP энергия возбужденного состояния S_1 сосредоточена в основном в виде высокоэнергетического экситонного состояния E_1 , а не в виде низкоэнергетического экситонного состояния E_2 , напрямую согласуется с выводами, сделанными иностранными коллегами [Agostini et al., 2017; Agostini, Palm et al., 2018] относительно «энергетического устройства» димеров Хл типа «открытый сэндвич». Согласно их мнению, приведённому в обзоре литературы (см. главу 1.2.5.), такое распределение энергии между экситонными состояниями может быть энергетической адаптацией для как можно более частого перехода синглетного возбужденного состояния Хл в триплетное. Поскольку именно триплетно-возбужденный Хл способен через взаимодействие с кислородом воздуха генерировать такую форму АФК, как $^1\text{O}_2$, можно в итоге сделать предположение, что устройство хромофорной группы холобелков WSCP-II было адаптировано в ходе эволюционного процесса в сторону максимизации генерации АФК.

Обнаруженные нами в холобелках BoWSCP признаки протекания сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана важны как пример возможного фотохимического взаимодействия хромофорной группы холобелков WSCP и её аминокислотного окружения. Однако в ходе проведённых экспериментов не было возможности выявить связь данного процесса и фотохимической активности холобелков WSCP в отношении цитохрома с, поскольку не было возможности зафиксировать оба явления при одинаковых условиях облучения. Так, признаки фотовосстановления триптофана нами были зафиксированы при облучении холобелков в область 430 нм именно благодаря возможности сравнить результат возбуждения в состояние S_3 и последующей внутримолекулярной безизлучательной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$ с результатом прямого возбуждения состояния S_1 сравнимым количеством квантов света. Определить в рамках аналогичного эксперимента возможность протекания сверхбыстрой реакции фотовосстановления триптофана при возбуждении светом 670 нм было невозможно. Фотохимические же опыты, описанные данной работой, осуществляли при облучении светом с длиной волны 650 нм и более, где поглощением света молекулами цитохрома с можно было пренебречь; в области шкалы длин волн при 430 нм (состояние S_3 Хл) цитохром с сам очень интенсивно поглощает свет и поэтому избирательное возбуждение хромофора WSCP светом с данной длиной волны было бы невозможно в смеси с цитохромом с.

Таким образом, для исследования возможного наличия или отсутствия связи между процессами фотовосстановления триптофана внутри холобелка BoWSCP и фотоиндуцируемым им через образование O_2^{*-} восстановлением цитохрома *c* необходимо проводить дополнительные опыты, в которых нужно либо использовать альтернативный (не связанный с цитохромом *c*) способ избирательно детектировать O_2^{*-} при облучении холобелков BoWSCP светом 430 нм, либо в которых нужно каким-либо образом зафиксировать протекание (или отсутствие протекания) сверхбыстрой реакции фотовосстановления триптофана при возбуждении красным светом при комнатной температуре. Ещё в качестве дополнительного опыта, направленного на изучение данного вопроса, можно предложить проверку на способность фотоиндуцировать восстановление цитохрома *c* холобелками WSCP с аминокислотными заменами а.о. Trp-90 и Trp-154; однако получение таких холобелков будет сильно затруднено, так как данная мутация, как было упомянуто в обзоре литературы, сильно затруднит процесс извлечения Хл из мембран [Girr, Paulsen, 2021].

4.2. Анализ способности холобелков WSCP-II генерировать АФК. Возможная физиологическая роль данных холобелков

В результате данного диссертационного произведения было продемонстрировано, что холобелки BoWSCP и LvWSCP при облучении красным светом в присутствии кислорода воздуха окисляют NADH и аскорбат, а также восстанавливают цитохром *c*. Данные факты в совокупности однозначно указывают на возможность сенсibilизации холобелками WSCP-II фотохимических реакций второго типа [Foote, 1976].

Прямого взаимодействия молекулы-сенсibilизатора с находящимися в растворе окисляемыми/восстанавливаемыми молекулами (по механизму первого типа) нами зафиксировано не было. Можно предположить, что главным образом это обусловлено недоступностью пигмента (экранированного белковой частью Хл-белковых комплексов от среды) для относительно крупных молекул типа NADH, аскорбата или цитохрома *c*. Однако результаты фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» свидетельствуют о том, что в холобелках BoWSCP может протекать фотохимическая реакция переноса электрона с Хл на аминокислотные остатки триптофана, контактирующие с порфириновым кольцом пигмента, что можно условно описать как фотохимическую реакцию первого типа. Аналогичный процесс, согласно данным литературы [Kell et al., 2016] происходит и в холобелках LvWSCP. Таким образом, мы зафиксировали, что белки WSCP могут участвовать в фотохимических реакциях как по механизму первого типа (со своим аминокислотным окружением), так и по механизму второго типа (с экзогенными донорами и акцепторами

электрона), но соотнести наблюдаемые реакции обоих типов друг с другом и выявить между ними какую-либо связь, как уже было сказано ранее, на данный момент мы не можем.

Процесс восстановления цитохрома *c* холобелками WSCP-II имел как светозависимый вклад, исчезающий при отсутствии облучения красным светом или при отсутствии холобелков WSCP-II в пробе, так и «темновой» вклад, который вычитали при анализе результатов опытов. Данный вклад, как можно предположить, является или проявлением процесса медленного самовосстановления цитохрома *c* в Трис-буфере [Ichimura et al., 2006], или следствием действия фонового светового излучения, интенсивность которого оценивалась примерно в $1\text{--}4 \mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. Скорость фотовосстановления цитохрома *c* холобелками WSCP-II зависела от интенсивности облучающего красного света, а также от концентрации цитохрома *c* в пробе.

В литературе имеются данные о способности O_2^{*-} восстанавливать цитохром *c* [Butler et al., 1975; Korppenol et al., 1976; Butler et al., 1982], и в наших опытах взаимодействие цитохрома *c* и холобелка BoWSCP по механизму второго типа, сопряженному с генерацией O_2^{*-} , нашло экспериментальное подтверждение. Подтверждение было получено как через факт ингибирования реакции восстановления ионами меди, препятствующими взаимодействию цитохрома *c* и O_2^{*-} [Butler et al., 1982], так и через факт ингибирования реакции специфически убирающим супероксидный анион-радикал ферментом – супероксиддисмутазой, а также через факт падения скорости фотовосстановления цитохрома *c* (вплоть до отсутствия разницы с «контролем в темноте») при усилении продувки пробы аргоном.

Согласно данным литературы, NADH и аскорбат [Егоров, 2007] взаимодействуют с $^1\text{O}_2$, а Хл в составе холобелков WSCP-II способен генерировать $^1\text{O}_2$ как минимум со сниженной в 4 раза скоростью относительно свободных молекул Хл [Schmidt et al., 2003; Agostini et al., 2017]. В совокупности всё это позволяет выдвинуть согласующуюся с данными литературы гипотезу об окислении NADH и аскорбата $^1\text{O}_2$, генерируемым под воздействием красного света холобелками WSCP-II. Данную гипотезу косвенно подтверждает разница между скоростями окисления NADH и аскорбата в данном фотохимическом процессе: аскорбат окисляется быстрее NADH примерно в 2,4 раза, что близко к разнице в 1,9 раза между константами тушения молекул $^1\text{O}_2$ для аскорбата ($4\pm 2\times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$) и для NADH ($2,1\pm 0,7\times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$) [Егоров, 2007]. Также данную гипотезу подтверждает факт продемонстрированного нами замедления скоростей окисления NADH и аскорбата при добавлении к образцам азид натрия – активного тушителя $^1\text{O}_2$. Константа скорости тушения $^1\text{O}_2$ азидом натрия, рассчитанная из данных наших опытов (см. уравнение 1) как равная $5,65\pm 1,9\times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, примерно совпадает со значением константы $4,4\pm 0,8\times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, взятом из литературы [Егоров, 2007], что указывает на тушение фотохимической реакции азидом натрия именно через взаимодействие с $^1\text{O}_2$. В то же время, добавление азид натрия не уменьшало скорость фотодеградаци Хл в составе холобелков WSCP-II, очевидно, вызванного

действием свежееобразованных АФК (фотодеградацию Хл уменьшало только снижение содержания кислорода в пробе). Согласно нашим данным, скорость фотохимического окисления NADH и аскорбата у холобелков BoWSCP (класс IIA) и LvWSCP (класс IIB) одинакова. Это говорит о том, что аминокислотный состав белков в составе ПБК, а также соотношение в них Хл *a* к Хл *b* не оказывают заметного влияния на способность генерировать $^1\text{O}_2$.

Функциональная роль белков WSCP-II в настоящее время до конца не ясна. Достаточно хорошо изучены функции данных белков, связанные с их принадлежностью к ингибиторам протеиназ Кунитц-типа и проявлением ими протеиназ-ингибирующей активности [Boex-Fontvieille et al., 2015; Boex-Fontvieille et al., 2016; Bouargalne et al., 2023]. При этом возможные функции данных белков, связанные с их способностью связывать Хл, являются дискуссионной областью. Поскольку способности ингибировать протеиназы и связывать Хл развиты в разной степени у каждого представителя семейства WSCP-II, а в тех представителях семейства, в которых белок проявляет обе способности, связывание Хл может как ослаблять [Rustgi et al., 2017], так и усиливать протеиназ-ингибирующую активность белка WSCP [Bouargalne et al., 2023], автор считает, что функциональную роль данных способностей надо рассматривать отдельно.

Если говорить о функциях белков WSCP-II, связанных с их способностью связывать Хл, то ранее в литературе предполагали, что они связывают Хл или предшественников его синтеза либо с целью транспортировки и депонирования, либо с целью предотвращения генерации им АФК и дальнейшей его утилизации [Schmidt et al., 2003; Reinbothe et al., 2004; Takahashi et al., 2012]. Однако результаты нашей работы не поддерживают данные гипотезы, так как в них показана явная фотохимическая активность холобелков WSCP-II, и данные белки никак не могли преобразовать Хл или его производные в безопасные для растительных клеток ПБК. Все вышеизложенные данные о фотохимической активности холобелков WSCP-II, а также данные об их высокой фотоустойчивости в ходе участия в фотохимических реакциях позволяют предположить, что данные молекулы специально адаптированы к максимально долгой генерации таких АФК, как $^1\text{O}_2$ и O_2^{*-} .

Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть возможную фотопротекторную роль холобелков WSCP в растениях, необходимо каким-либо образом сравнить их способность генерировать АФК с аналогичной способностью молекул Хл, которые гипотетически находились бы в поврежденной растительной клетке и не имели бы каких-либо сдерживающих факторов в генерации АФК. В качестве такой условной модели можно рассматривать, например, молекулы Хл *a* в мицеллах детергента Тритон-X100. Мы провели опыт, аналогичный по условиям опыту на рисунке 25, в котором вместо холобелков WSCP добавляли водно-детергентную эмульсию 2% Тритона X-100 с Хл *a*. Интеграл спектров светопоглощения данных двух препаратов (с учётом

спектра светопропускания светофильтра КС-15) не различался более чем на 3%. Результаты данной замены показаны на рисунке 36.

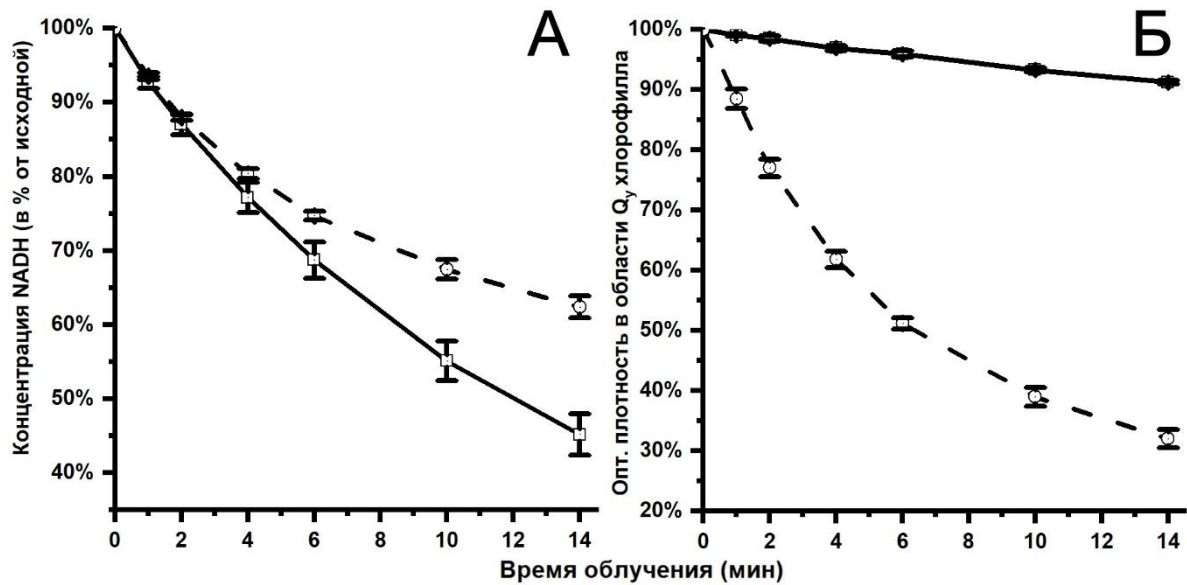


Рисунок 36. Зависимость концентрации NADH (панель А) и оптической плотности Хл в пике поглощения Q_y-перехода (панель Б) от времени инкубации на свету препарата с Хл-белковыми комплексами BoWSCP (сплошная линия, ■) и с водно-детергентной эмульсией Тритона X-100 (2%) с Хл *a* (пунктир, ●) в присутствии кислорода. Данные для опыта с BoWSCP аналогичны данным на рисунке 25. Опыты проводили в атмосфере воздуха.

Как показали результаты сравнения (рисунок 36), холобелки BoWSCP многократно превосходят Хл *a* в водно-детергентной эмульсии в устойчивости к действию света и устойчивости к генерируемым этими же сенсibilизаторами АФК. Одновременно с этим на первых минутах облучения светом (пока ещё основная доля Хл в мицеллах не подверглась фотодеструкции) скорость окисления NADH АФК в двух сравниваемых системах была относительно одинаковой. Осуществлённое таким образом сравнение наглядно показывает, что белки WSCP-II, связывая Хл из липидных мембран в водорастворимые комплексы, многократно повышают устойчивость Хл без значительного подавления его возможности генерировать АФК. Подобное действие трудно совместить с ранее приписываемыми к данным белкам фотопротекторными функциями.

Какую же в таком случае функциональную роль могут играть связавшие Хл холобелки WSCP-II? Автор предполагает, что данные ПБК играют защитную роль от насекомых-фитофагов, грибов и других физически разрушающих растительные клетки патогенов, стабильно генерируя АФК, которые либо наносят прямой ущерб патогенным организмам, либо действуют в качестве сигнальных молекул – модуляторов защитных механизмов растений. Данное предположение основано на совокупности следующих литературных данных и результатов нашей работы:

- 1) Литературные данные указывают, что многие представители WSCP-II имеют внутриклеточную локализацию в так называемых эндоплазматических тельцах – особых защитных структурах эндоплазматического ретикулума. Обычно содержащиеся в эндоплазматических тельцах белки необходимы для производства токсичных соединений, которые обеспечивают защиту растений от насекомых или патогенных грибов. Субстрат для данных ферментов часто запасается в отдельных вакуолях, и не контактирует с ферментами до момента физического разрушения клетки [Yamada et al., 2011]. В случае белков WSCP-II таким субстратом, очевидно, является Хл в составе тилакоидных мембран, к которым апобелки WSCP-II тоже не могут иметь физического доступа без разрушения клетки.
- 2) Многие представители WSCP-II синтезируются в растениях, подверженных стрессовым условиям. Такими стрессовыми условиями может быть либо непосредственно атака патогенов, либо тяжелые условия окружающей среды, которые истощают адаптационные ресурсы растительного организма. Можно предположить, что в последнем случае организм заранее синтезирует защитные белки на случай атаки патогенов на ослабленный, не способный оперативно активировать защитные механизмы организм. Так, например, синтез белка BnD22 индуцировали азотное голодание или обработка метилжасмонатом – стрессовым гормоном, модулирующим защитные реакции растений, например, при поедании насекомыми или при получении других физических повреждений [Desclos et al., 2008].
- 3) Данные нашего биоинформатического исследования позволяют предположить, что способность связывать Хл среди ингибиторов протеиназ Кунитц-типа – предков членов семейства WSCP-II – могла появляться неоднократно путём накопления точечных мутаций. Происходить это могло в том числе в растениях не из семейства *Brassicaceae*, не связанных с ним очевидными эволюционными связями. Примеры – последовательности «Miraculin» из *Artemisia annua* (A0A2U1Q6C0), «Kunitz trypsin inhibitor» из *Nicotiana tabacum* (B8Y888), «Miraculin like sequence» из *Capsicum annuum* (A0A2G2ZCU6). Это указывает на то, что способность ингибиторов протеиназ Кунитц-типа связывать Хл эволюционно развивались не для выполнения специфической, актуальной лишь для определённого семейства растений функции, но для решения распространённой проблемы, актуальной для многих семейств растений. Такой актуальной для растений в целом проблемой как раз можно считать защиту от фитофагов и прочих патогенов.
- 4) Молекулы $^1\text{O}_2$, согласно последним обзорным публикациям, являются сигнальными молекулами, конечный эффект от которых по причине их короткого времени жизни

очень зависит от места генерации этих молекул и того, какие в нём образуются вторичные сигнальные молекулы [Goggin et al., 2024; Zhao et al., 2026]. Существует сложная взаимосвязь между $^1\text{O}_2$ и сигнальными сетями двух ключевых защитных гормонов — жасмоновой кислоты и салициловой кислоты [Zhao et al., 2026]. И есть данные, что сигнальные ответы растительной клетки на $^1\text{O}_2$ частично совпадают с сигнальными ответами растительной клетки на атаку биологических патогенов [Goggin et al., 2024].

- 5) Результаты нашей работы наглядно показывают, что холобелки WSCP-II обладают фотохимической активностью по отношению к широкому спектру биологически важных молекул (NADH, аскорбат, цитохром *c*), опосредованной генерацией различных форм АФК ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$), что потенциально очень опасно для живых тканей. Также в нашей работе показано, что данные холобелки очень устойчивы в ходе фотохимических реакций, их способность поглощать свет практически не меняется в широком диапазоне pH и температуры. То есть в целом данные холобелки очень устойчивы к неблагоприятным условиям среды, которые могут формироваться, например, в разрушенных патогеном тканях растения или в пищеварительном тракте насекомых.

В итоге из совокупности как данных литературы, так и результатов наших исследований, складывается непротиворечивый образ холобелков WSCP-II как опасных и вредных для потенциальных патогенов - разрушителей растительных клеток - молекул, которые адаптированы к максимально долгой и эффективной генерации различных форм АФК даже в физиологически неблагоприятных условиях. Если провести мысленный эксперимент и попробовать представить, какими способами фитопатогены могли бы защищаться от них, то можно обнаружить лишь два сложно реализуемых в масштабе живого организма механизма — обеспечение полного отсутствия кислорода в среде или полное изолирование данных холобелков от глубоко проникающей красной части спектра солнечного излучения. Таким образом, потенциальные пути патогенных организмов по защите от холобелков WSCP-II гораздо сложнее в реализации, чем пути по защите от обычных ингибиторов протеиназ Кунитц-типа. Подтверждение такой защитной функции холобелков WSCP-II требует дополнительных исследований.

Также возможно, что функция холобелков WSCP-II как генераторов $^1\text{O}_2$ обусловлена не только прямым повреждающим действием АФК на чужеродные организмы, но и сигнальной функцией данной формы АФК. И тут важно отметить, что, благодаря своей водорастворимости, холобелки WSCP могут не только генерировать устойчивый и интенсивный сигнал в виде $^1\text{O}_2$, но и делать это там, где $^1\text{O}_2$ при нормальной жизнедеятельности клетки почти не встречается

(например, вдали от хлоропластов). В таких местах потенциально могут присутствовать пока не открытые молекулы-рецепторы $^1\text{O}_2$, защищенные своей удалённостью от «ложного срабатывания» и поэтому инициирующие важные, но специфические сигнальные пути.

4.3. Перспективы использования белков WSCP-II в биотехнологии и медицине

В период выполнения диссертационной работы иностранные исследователи опубликовали несколько работ, прямо посвященных возможным практическим применениям холобелков WSCP-II.

В хронологически первой работе Dodge с соавторами (2020) продемонстрировали пример использования данных белков в биотехнологии в качестве фотосенсибилизатора химической реакции – продуцента из кислорода и аскорбата перекиси водорода для литических полисахаридмонооксигеназ (LPMO) и опосредуемой ими деполимеризации целлюлозы. Хотя в данном случае и использовался аскорбат для химического превращения $^1\text{O}_2$ в перекись водорода [Dodge et al., 2020], холобелки WSCP-II имеют потенциал использования в качестве фотокатализатора химических реакций, в которых участвует $^1\text{O}_2$ или O_2^{*-} . Примером таких реакций могут быть реакция Альдера («ene reaction») или реакция Дильса-Альдера [Goggin et al., 2024].

Вторым освещенным в литературе примером прикладного использования холобелков WSCP-II было их применение в качестве фоторегулятора активности искусственных «безмембранных органелл» [Li, Park et al., 2022]. Холобелки инкрустировали «безмембранные органеллы» и управляемо их «выключали» под воздействием света за счёт генерации АФК и снижения под их воздействием проницаемости органеллы для субстратов [Li, Park et al., 2022].

Третьим направлением исследований по практическому применению белков WSCP-II является их адаптация для использования в медицине. Белок LvWSCP исследовали на возможность быть контрастирующим агентом для спектроскопической фотоакустической визуализации опухолей [Tsang et al., 2025], а также на возможность применения как средства фотодинамической терапии [Liang et al., 2025]. Согласно данным исследованиям, эффективность генерации холобелками LvWSCP $^1\text{O}_2$ при облучении красным светом 660 нм была на порядок выше, чем у хлорина e6 (Ce6) [Liang et al., 2025]. Холобелок в комбинации со световым облучением подавлял развитие раковых клеток как в опытах с клеточными культурами, так и в опытах на мышах, при этом в отсутствие света токсического действия не наблюдалось [Liang et al., 2025].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачей данной работы было выявление фотохимической активности водорастворимых Хл-связывающих белков растений WSCP класса II на примере двух его представителей – BoWSCP из *Brassica oleracea* var. *botrytis* и LvWSCP из *Lepidium virginicum*. Выбор этих белков был обусловлен тем фактом, что только для данных двух белков WSCP-II достоверно установлена трехмерная структура. Исследование проводили с использованием препаратов, полученных с помощью метода гетерологичной экспрессии соответствующих генов в клетках *E. coli* штамма BL21DE3. Апобелки BoWSCP и LvWSCP переводили в содержащую Хл холоформу по модифицированной нами методике, включающей инкубацию апобелков со свежевыделенным осадком тилакоидов, предварительную очистку полученных в результате инкубации холоформ нагреванием и последующую аффинную хроматографию на Ni-агарозе. Анализ полученных препаратов электрофоретическими и спектроскопическими методами подтвердил нативность содержащихся в них холобелков BoWSCP и LvWSCP.

Основным результатом данной работы является выявление фотохимической активности у холобелков WSCP-II. Данная активность была обнаружена в результате исследований в двух направлениях. Первым направлением являлся поиск свидетельств фотохимической активности возбужденного хлорофилла в составе WSCP-II с помощью анализа сверхбыстрых (в фемто- и пикосекундном диапазоне времени) процессов, происходящих в холобелке BoWSCP после поглощения кванта света. В рамках исследования в данном направлении мы применили современный метод широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Анализ полученных данных выявил свидетельство протекания обратимой фотохимической реакции между Хл и остатком триптофана холобелка. Установление возможной физиологической функции данной реакции, а также её связи с другими проявлениями фотохимической активности холобелков WSCP-II требуют дополнительных исследований.

Вторым направлением является определение фотохимической активности холобелков WSCP-II в рамках фотохимических опытов с экзогенными донорами и акцепторами электрона при облучении красным светом. В настоящей работе продемонстрирована способность холобелков BoWSCP и LvWSCP осуществлять фотохимические реакции с экзогенными донорами (окисление NADH и аскорбата) и акцепторами (восстановление цитохрома c) электрона. Установлено, что данные реакции осуществляются посредством генерации холобелками различных форм АФК – $^1\text{O}_2$ (окисляет NADH и аскорбат) и O_2^{*-} (восстанавливает цитохром c) и по классификации Foote C.S. относятся к фотохимическим реакциям второго типа.

Приведённые данные представляют интерес для развития следующих научных направлений. Прежде всего, они расширяют представления о фотохимической активности Хл в

составе Хл-белковых комплексов. Показана способность водорастворимых холобелков WSCP-II окислять и восстанавливать окружающие молекулы посредством образования АФК – $^1\text{O}_2$ и O_2^{*-} , причём скорость окисления NADH сравнима со скоростью данного процесса у несвязанных с белками молекул Хл в мицеллах детергента.

Данные, полученные в работе, позволяют также подойти к пониманию физиологической роли белков WSCP-II. В ходе работы отмечена устойчивость холобелков WSCP-II к фотодеструкции, которая многократно превышает устойчивость к свету несвязанных с белками молекул Хл в мицеллах детергента. Это в совокупности с близкой скоростью фотоокисления данными фотосенсибилизаторами окружающих молекул (на примере NADH) ставит под сомнение приписываемую ранее белкам WSCP-II функциональную роль как сборщиков Хл, защищающих клетку от образования АФК.

Полученные данные интересны и с точки зрения эволюции Хл-связывающих белков в биологических системах. Они свидетельствуют о том, что Хл может быть фотохимически активным не только в мембран-связанных белках фотосинтетического аппарата, но и в водорастворимых комплексах, образованных белками WSCP-II.

Приведённые данные интересны также для применения в биотехнологии. В практическом плане устойчивость холобелков WSCP-II к свету, а также к различным значениям pH раствора и температуры делает их перспективными для использования в качестве фоторегуляторов, фотокатализаторов и средств фотодинамической терапии. В настоящее время появились публикации, описывающие использование холобелков WSCP-II как фоторегуляторов активности белковых комплексов («безмембранных органелл»), содержащих каспазу-3 в качестве активного фермента. Холобелки WSCP-II при облучении светом вызвали сшивание белков в наружной зоне «безмембранных органелл», останавливая работу ферментов внутри этих комплексов. Также имеются работы, описывающие использование холобелков WSCP-II как источников перекиси водорода для литических полисахаридмонооксигеназ, перерабатывающих целлюлозу. В плане биомедицины представляют реальный интерес работы, в которых белки WSCP используются для конструирования средств фотодинамической терапии.

ВЫВОДЫ

- 1) С использованием оптимизированного протокола получены и охарактеризованы очищенные холобелки WSCP-II. Характеристики полученных холобелков соответствовали показателям нативных холобелков, приведенным в научной литературе.
- 2) Анализ переходных спектров поглощения, полученных методом фемтосекундной спектроскопии, выявил свидетельство протекания обратимой фотохимической реакции между Хл и остатком триптофана холобелка WSCP-II.
- 3) Установлена фотохимическая активность холобелков WSCP-II, проявляющаяся в окислении экзогенных молекул – NADH и аскорбата. Показано, что процесс фотоокисления опосредован участием синглетного кислорода, генерируемого триплетно-возбужденными молекулами Хл в составе холобелков WSCP-II.
- 4) Обнаружена фотохимическая активность холобелков WSCP-II, заключающаяся в восстановлении цитохрома *c*. Анализ механизмов процесса показал участие супероксидного анион-радикала.
- 5) Показана устойчивость структуры холобелка и хромофорной группы WSCP-II в процессе сенсibilизации ими фотохимических реакций, устойчивость к действию светового излучения, а также изменениям температуры и pH среды. Данный факт важен в плане оценки перспектив использования холобелков WSCP для биотехнологических разработок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брюханов А.А., Нетрусов А.И., Рыбак К.Е. Молекулярная микробиология: учебник для вузов / под ред. А. И. Нетрусова. — Москва: Издательство Московского университета, 2012. — 480 с.
2. Егоров С.Ю. Фотосенсибилизированное образование и дезактивация синглетного молекулярного кислорода и их роль в биологических системах: диссертация доктора биологических наук: 03.00.02 / Егоров Сергей Юрьевич. — Москва: МГУ, 2007. — 350 с.
3. Клейтон, Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели / Р. Клейтон; пер. с англ. А. А. Косова, В. И. Крутова, А. А. Красновского; под ред. и с предисл. А. А. Красновского. — Москва: Мир, 1984. — 350 с.
4. Скулачёв В. П., Богачев А. В., Каспаринский Ф. О. Мембранная биоэнергетика: учебное пособие. — М.: Издательство Московского Университета, 2010. — 368 с.
5. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфелдер; пер. с англ. под ред. Э.Г. Ларского. — Москва: Мир, 1980. — 581 с.
6. Черепанов Д.А., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Гостев Ф.Е., Шелаев И.В., Айбуш А.В., Крицкий М.С., Надточенко В.А. Фемтосекундная динамика возбужденных состояний тетрамера хлорофилла в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – №. 10. – С. 1908-1925.
7. Adolphs J., Berrier M., Renger T. Hole-burning spectroscopy on excitonically coupled pigments in proteins: theory meets experiment // Journal of the American Chemical Society. – 2016. – Т. 138. – №. 9. – С. 2993-3001.
8. Adolphs J., Maier F., Renger T. Wavelength-Dependent Exciton–Vibrational Coupling in the Water-Soluble Chlorophyll Binding Protein Revealed by Multilevel Theory of Difference Fluorescence Line-Narrowing // The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – Т. 122. – №. 38. – С. 8891-8899.
9. Agostini A., Meneghin E., Gewehr L., Pedron D., Palm D.M., Carbonera D., Paulsen H., Jaenicke E., Collini E. How water-mediated hydrogen bonds affect chlorophyll *a/b* selectivity in Water-Soluble Chlorophyll Protein // Scientific reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 18255.
10. Agostini A., Niklas J., Schulte T., Di Valentin M., Bortolus M., Hofmann E., Lubitz W., Carbonera, D. Changing the site energy of per-614 in the Peridinin-chlorophyll *a*-protein does not alter its capability of chlorophyll triplet quenching // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2018. – Т. 1859. – №. 8. – С. 612-618.
11. Agostini A., Palm D. M., Paulsen H., Carbonera D. Optically Detected Magnetic Resonance of Chlorophyll Triplet States in Water-Soluble Chlorophyll Proteins from *Lepidium virginicum*:

Evidence for Excitonic Interaction among the Four Pigments // The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – T. 122. – №. 23. – C. 6156-6163.

12. Agostini A., Palm D. M., Paulsen H., Di Valentin M., Carbonera D. Electron nuclear double resonance of the chlorophyll triplet state in the water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea*: investigation of the effect of the binding site on the hyperfine couplings // Applied Magnetic Resonance. – 2020. – T. 51. – №. 9. – C. 925-937.

13. Agostini A., Palm D. M., Schmitt F.-J., Albertini M., Valentin M. D., Paulsen H., Carbonera D. An unusual role for the phytol chains in the photoprotection of the chlorophylls bound to Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins // Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-13.

14. An X. Totozafy J. C., Peaucelle A., Jones C. Y., Willats W. G., Höfte H., Corso M., Verbruggen N. Contrasting Cd accumulation of *Arabidopsis halleri* populations: a role for (1→4)-β-galactan in pectin // Journal of Hazardous Materials. – 2023. – T. 445. – C. 130581.

15. Annamalai P., Yanagihara S. Identification and characterization of a heat-stress induced gene in cabbage encodes a Kunitz type protease inhibitor // Journal of plant physiology. – 1999. – T. 155. – №. 2. – C. 226-233.

16. Azarkan M., Martinez-Rodriguez S., Buts L., Baeyens-Volant D., Garcia-Pino A. The plasticity of the β-trefoil fold constitutes an evolutionary platform for protease inhibition // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – T. 286. – №. 51. – C. 43726-43734.

17. Bednarczyk D., Dym O., Prabakar V., Peleg Y., Pike D. H., Noy D. Fine Tuning of Chlorophyll Spectra by Protein-Induced Ring Deformation // Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – T. 55. – №. 24. – C. 6901-6905.

18. Bednarczyk D., Takahashi S., Satoh H., Noy D. Assembly of water-soluble chlorophyll-binding proteins with native hydrophobic chlorophylls in water-in-oil emulsions // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2015. – T. 1847. – №. 3. – C. 307-313.

19. Bednarczyk D., Tor-Cohen C., Das P.K., Noy D. Direct Assembly in Aqueous Solutions of Stable Chlorophyllide Complexes with Type II Water-soluble Chlorophyll Proteins // Photochemistry and Photobiology. – 2021. – T. 97. – №. 4. – C. 732-738.

20. Bektas I., Fellenberg C., Paulsen H. Water-soluble chlorophyll protein (WSCP) of *Arabidopsis* is expressed in the gynoecium and developing silique // Planta. – 2012. – T. 236. – №. 1. – C. 251-259.

21. Blankenship R. E. Molecular mechanisms of photosynthesis. — John Wiley & Sons, 2002. — 321 c.

22. Blankenship R.E. Early Evolution of Photosynthesis // Plant physiology. – 2010. – T. 154. – №. 2. – C. 434-438.

23. Boex-Fontvieille E., Rustgi S., Von Wettstein D., Pollmann S., Reinbothe S., Reinbothe C. An ethylene-protected Achilles' heel of etiolated seedlings for arthropod deterrence // *Frontiers in plant science*. – 2016. – T. 7. – C. 1246.
24. Boex-Fontvieille E., Rustgi S., Von Wettstein D., Reinbothe S., Reinbothe C. Water-soluble chlorophyll protein is involved in herbivore resistance activation during greening of *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – T. 112. – №. 23. – C. 7303-7308.
25. Bouargalne Y., Guilbaud F., Macherel D., Delalande O., Deleu C., Le Cahérec F. *Brassica napus* Drought-Induced 22-kD Protein (BnD22) Acts Simultaneously as a Cysteine Protease Inhibitor and Chlorophyll-Binding Protein // *Plant and Cell Physiology*. – 2023. – T. 64. – №. 5. – C. 536-548.
26. Bouargalne Y., Raguénès-Nicol C., Guilbaud F., Cheron A., Clouet V., Deleu C., Le Cahérec F. New insights into chlorophyll-WSCP (water-soluble chlorophyll proteins) interactions: The case study of BnD22 (*Brassica napus* drought-induced 22 kDa) // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2022. – T. 181. – C. 71-80.
27. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – T. 72. – №. 1-2. – C. 248-254.
28. Butler J., Jayson G. G., Swallow A. J. The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome *c* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1975. – T. 408. – №. 3. – C. 215-222.
29. Butler J., Koppenol W. H., Margoliash E. Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome *c* by the superoxide anion // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – T. 257. – №. 18. – C. 10747-10750.
30. Carbonera D., Di Valentin M., Spezia R., Mezzetti A. The unique photophysical properties of the Peridinin-Chlorophyll-*a*-Protein // *Current Protein and Peptide Science*. – 2014. – T. 15. – №. 4. – C. 332-350.
31. Caycedo-Soler F., Mattioni A., Lim J., Renger T., Huelga S. F., Plenio M. B. Exact simulation of pigment-protein complexes unveils vibronic renormalization of electronic parameters in ultrafast spectroscopy // *Nature Communications*. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 1-8.
32. Charlton A., Zachariou M. Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins // *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*. – 2008. – C. 137-150.
33. Cherepanov D.A., Milanovsky G.E., Neverov K.V., Obukhov Y.N., Maleeva Y.V., Aybush A.V., Kritsky M.S., Nadtochenko V.A. Exciton interactions of chlorophyll tetramer in water-soluble chlorophyll-binding protein BoWSCP // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – T. 309. – C. 123847.

34. Ciuti S., Agostini A., Barbon A., Bortolus M., Paulsen H., Di Valentin M., Carbonera D. Magnetophotoselection in the Investigation of Excitonically Coupled Chromophores: The Case of the Water-Soluble Chlorophyll Protein // *Molecules*. – 2022. – T. 27. – №. 12. – C. 3654.
35. Clementson L. A., Wojtasiewicz B. Dataset on the absorption characteristics of extracted phytoplankton pigments // *Data in brief*. – 2019. – T. 24. – C. 103875.
36. Damaraju S., Schlede S., Eckhardt U., Lokstein H., Grimm B. Functions of the water soluble chlorophyll-binding protein in plants // *Journal of plant physiology*. – 2011. – T. 168. – №. 12. – C. 1444-1451.
37. Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Caherec F. X. L., Satoh H., Bonnefoy J., Ourry A., and Avice J.-C. A Proteomic Profiling Approach to Reveal a Novel Role of *Brassica napus* Drought 22 kDa/Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein in Young Leaves during Nitrogen Remobilization Induced by Stressful Conditions // *Plant Physiology*. – 2008. – T. 147. – №. 4. – C. 1830-1844.
38. Dobryakov A.L., Kovalenko S.A., Weigel A., Pérez-Lustres J.L., Lange J., Müller A., Ernsting N.P. Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing // *Review of Scientific Instruments*. – 2010. – T. 81. – №. 11. – C. 113106
39. Dobryakov A.L., Lustres J.P., Kovalenko S.A., Ernsting N.P. Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications // *Chemical Physics*. – 2008. – T. 347. – №. 1-3. – C. 127-138.
40. Dodge N., Russo D. A., Blossom B. M., Singh R. K., van Oort B., Croce R., Bjerrum M. J., Jensen P. E. Water-soluble chlorophyll-binding proteins from *Brassica oleracea* allow for stable photobiocatalytic oxidation of cellulose by a lytic polysaccharide monooxygenase // *Biotechnology for biofuels*. – 2020. – T. 13. – №. 1. – C. 1-12.
41. Downing W.L., Mauxion F., Fauvarque M.O., Revirion M.P., De Vienne D., Vartanian N., Giraudat J. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds // *The Plant Journal*. – 1992. – T. 2. – №. 5. – C. 685-693.
42. EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Clustal Omega multiple sequence alignment program. — URL: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (дата обращения: 18.02.2020)
43. Fenna R.E., Matthews B.W. Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*. // *Nature*. – 1975. – T. 258. – №. 5536. – C. 573-577.

44. Foote C.S. Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems // Free radicals in biology / ed. by W.A. Pryor. — Vol. II. — New York: Academic Press, 1976. — C. 83–133.
45. Fresch E., Meneghin E., Agostini A., Paulsen H., Carbonera D., Collini E. How the protein environment can tune the energy, the coupling, and the ultrafast dynamics of interacting chlorophylls: The example of the water-soluble chlorophyll protein // The journal of physical chemistry letters. – 2020. – T. 11. – №. 3. – C. 1059-1067.
46. Friedl C., Fedorov D. G., Renger T. Towards a quantitative description of excitonic couplings in photosynthetic pigment–protein complexes: quantum chemistry driven multiscale approaches // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2022. – T. 24. – №. 8. – C. 5014-5038.
47. Gholizadeh A. Chlorophyll binding ability of non-chloroplastic DUF538 protein superfamily in plants. // Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 2016. – T. 88. – №. 3. – C. 967-976.
48. Gholizadeh A. DUF538 protein superfamily is predicted to be chlorophyll hydrolyzing enzymes in plants // Physiology and molecular biology of plants. – 2015. – T. 22. – №. 1. – C. 77-85.
49. Gholizadeh A. Pectin methylesterase activity of plant DUF538 protein superfamily // Physiology and molecular biology of plants. – 2020. – T. 26. – №. 4. – C. 829-839.
50. Gholizadeh A. Plants Water Soluble Chlorophyll Binding Proteins Act as Enzyme-Inhibitor Pair // Russian Journal of Plant Physiology. – 2017. – T. 64. – №. 1. – C. 91-99.
51. Girr P., Kilper J., Pohland A. C., Paulsen H. The pigment binding behaviour of water-soluble chlorophyll protein (WSCP) // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2020. – T. 19. – №. 5. – C. 695-712.
52. Girr P., Paulsen H. How water-soluble chlorophyll protein extracts chlorophyll from membranes // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2021. – T. 1863. – №. 1. – C. 183479
53. Goedheer J. C., Vos M. On The Origin Of The Photoconvertible Chlorophyll-Protein Complex Cp668 → Cp743 In *Chenopodium* And *Amaranthus* Species // Acta Botanica Neerlandica. – 1977. – T. 26. – №. 4. – C. 289-298.
54. Goggin F. L., Fischer H. D. Singlet oxygen signalling and its potential roles in plant biotic interactions // Plant, Cell & Environment. – 2024. – T. 47. – №. 6. – C. 1957-1970.
55. Götze J. P., Pi Y. W., Petry S., Langkabel F., Witte J. F., Lemke O. A user-friendly, Python-based quantum mechanics/Gromacs interface: gmx2qmmm // International Journal of Quantum Chemistry. – 2021. – T. 121. – №. 3. – C. e26486.

56. Hagar W. G., Hiyama T. Characterization of the light-induced transient states of the chlorophyll proteins 668 and 743 from *Atriplex rosea* // *Plant Physiology*. – 1979. – T. 63. – №. 6. – C. 1182-1186.
57. Hajizadeh M., Golub M., Bektas I., Rusevich L. L., Embs J. P., Lohstroh W., Paulsen H., Pieper J. Modulation of Protein Dynamics by Glycerol in Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein (WSCP) // *Crystals*. – 2025. – T. 15. – №. 6. – C. 569.
58. Hald E., Lehmann P., Ziegenhorn J. Molar Absorptivities of β -NADH and β -NAD at 260 nm // *Clinical Chemistry*. – 1975. – T. 21. – №. 7. – C. 884-887.
59. Hartzler D.A., Niedzwiedzki D.M., Bryant D.A., Blankenship R.E., Pushkar Y., Savikhin S. Triplet excited state energies and phosphorescence spectra of (bacterio) chlorophylls // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – T. 118. – №. 26. – C. 7221-7232.
60. Hirabayashi H., Amakawa M., Kamimura Y., Shino Y., Satoh H., Itoh S., Tamiaki H. Analysis of photooxidized pigments in water-soluble chlorophyll protein complex isolated from *Chenopodium album* // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2006. – T. 183. – №. 1-2. – C. 121-125.
61. Hodgson E. K., Fridovich I. Interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide. Chemiluminescence and peroxidation // *Biochemistry*. – 1975. – T. 14. – №. 24. – C. 5299-5303.
62. Hofmann E., Wrench P.M., Sharples F.P., Hiler R.G., Welte W., Diederichs K. Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae* // *Science*. – 1996. – T. 272. – №. 5269. – C. 1788-1791.
63. Hohmann-Marriott M. F., Blankenship R. E. Evolution of photosynthesis // *Annual review of plant biology*. – 2011. – T. 62. – №. 1. – C. 515-548.
64. Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A. Structural Mechanism and Photoprotective Function of Water-soluble Chlorophyll-binding Protein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – T. 282. – №. 9. – C. 6525-6531.
65. Huang J., van der Hooft R. A. L. RD21-like proteases: key effector hubs in plant-pathogen interactions // *Journal of Experimental Botany*. – 2025. – T. 76. – №. 15. – C. 4212-4219.
66. Hughes J.L., Razeghifard R., Logue M., Oakley A., Wydrzynski T., Krausz E. Magneto-optic spectroscopy of a protein tetramer binding two exciton-coupled chlorophylls // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – T. 128. – №. 11. – C. 3649-3658.
67. Ichimura K., Nakahara Y., Inokuchi H. Self-reduction and Conductivities of Cytochromes // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. – 2006. – T. 455. – №. 1. – C. 99-104.

68. Ilami G., Nespoulous C., Huet J.C., Vartanian N., Pernollet J.C. Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves // *Phytochemistry*. – 1997. – T. 45. – №. 1. – C. 1-8.
69. Itoh R., Itoh S., Sugawa M., Oishi O., Tabata K., Okada M., Nishimura M., Yakushiji E. Isolation of crystalline water-soluble chlorophyll proteins with different chlorophyll *a* and *b* contents from stems and leaves of *Lepidium virginicum* // *Plant and Cell Physiology*. – 1982. – T. 23. – №. 3. – C. 557-560.
70. James M., Nexer E., Girondé A., Masclaux-Daubresse C., Marmagne A., Trouverie J., Etienne P. A *Brassica napus* water soluble chlorophyll binding protein (WSCP1) delays chlorophyll degradation and inhibits serine proteases during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 2025. – T. 262. – №. 2. – C. 39.
71. Jiang J., Zhang H., Kang Y., Bina D., Lo C.S., Blankenship R.E. Characterization of the peridinin–chlorophyll *a*-protein complex in the dinoflagellate *Symbiodinium*. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817. – №. 7. – C. 983-989.
72. Kamimura T., Mori Y., Yamasaki T., Katoh S. Isolation, Properties and a Possible Function of a Water-Soluble Chlorophyll *a/b*-Protein from Brussels Sprouts // *Plant and cell physiology*. – 1997. – T. 38. – №. 2. – C. 133-138.
73. Karayannis M. I., Samios D. N., Gousetis C. H. P. A study of the molar absorptivity of ascorbic acid at different wavelengths and pH values // *Analytica Chimica Acta*. – 1977. – T. 93. – C. 275-279.
74. Kell A., Bednarczyk D., Acharya K., Chen J., Noy D., Jankowiak R. New insight into the water-soluble chlorophyll-binding protein from *Lepidium virginicum* // *Photochemistry and Photobiology*. – 2016. – T. 92. – №. 3. – C. 428-435.
75. Kihara S., Hartzler D.A., Orf, G. S., Blankenship R.E. Savikhin S. The fate of the triplet excitations in the Fenna–Matthews–Olson complex // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – T. 119. – №. 18. – C. 5765-5772.
76. Kim H.H., Tsang V.T., Huang B., Chan S.C., Wong T.T. A photoconvertible *Chenopodium album* water-soluble-chlorophyll-binding protein as a contrast agent for photoacoustic imaging // 2025 47th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). – IEEE, 2025. – C. 1-7.
77. Kireev S.V., Shnyrev S.L. Study of molecular iodine, iodate ions, iodide ions, and triiodide ions solutions absorption in the UV and visible light spectral bands // *Laser Physics*. – 2015. – T. 25. – №. 7. – C. 075602.
78. Koppenol W.H., Van Buuren K.J.H., Butler J., Braams R. The kinetics of the reduction of cytochrome *c* by the superoxide anion radical // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1976. – T. 449. – №. 2. – C. 157-168.

79. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – T. 227. – №. 5259. – C. 680-685.
80. Lahav Y., Noy D., Schapiro I. Spectral tuning of chlorophylls in proteins—electrostatics vs. ring deformation // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2021. – T. 23. – №. 11. – C. 6544-6551.
81. Lemke O., Götze J.P. On the Stability of the Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein (WSCP) Studied by Molecular Dynamics Simulations // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – T. 123. – №. 50. – C. 10594-10604.
82. Li M., Park B.M., Dai X., Xu Y., Huang J., Sun F. Controlling synthetic membraneless organelles by a red-light-dependent singlet oxygen-generating protein // *Nature Communications*. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 1-13.
83. Liang L., Wang W., Li M., Xu Y., Lu Z., Wei J., Tang B.Z., Sun F., Tong R. Cancer Photodynamic Therapy Enabled by Water-Soluble Chlorophyll Protein // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2025. – T. 17. – №. 11. – C. 16668-16680.
84. Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // *Current protocols in food analytical chemistry*. – 2001. – T. 1. – №. 1. – C. F4.3.1-F4.3.8.
85. Liu M., Wang F., He B., Hu J., Dai Y., Chen, W., Yi M., Zhang H., Ye Y., Cui Z., Zheng X., Wang P., Xing W., Zhang, Z. Targeting Magnaporthe oryzae effector MoErs1 and host papain-like protease OsRD21 interaction to combat rice blast // *Nature plants*. – 2024. – T. 10. – №. 4. – C. 618-632.
86. Lopez F., Vansuyt G., Fourcroy P., Casse-Delbart F. Accumulation of a 22-kDa protein and its mRNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit // *Physiologia Plantarum*. – 1994. – T. 91. – №. 4. – C. 605-614.
87. Lowry O., Rosebrough N., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of biological chemistry*. – 1951. – T. 193. – №. 1. – C. 265-275.
88. Madeira F., Madhusoodanan N., Lee J., Eusebi A., Niewielska A., Tivey A. R., Lopez R., Butcher S. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024 // *Nucleic acids research*. – 2024. – T. 52. – №. W1. – C. W521-W525.
89. Mai M., Zazubovich V., Mansbach R. A. Identification of Residues Potentially Involved in Optical Shifts in the Water-Soluble Chlorophyll a-Binding Protein through Molecular Dynamics Simulations // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2024. – T. 128. – №. 6. – C. 1371-1384.
90. Matsuzaki E., Kamimura Y., Yamasaki T., Yakushiji E. Purification and properties of cytochrome *f* from *Brassica komatsuna* leaves // *Plant and cell physiology*. – 1975. – T. 16. – №. 2. – C. 237-246.

91. Mazor Y., Borovikova A., Nelson N. The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution // *elife*. – 2015. – Т. 4. – С. e07433.
92. Molbiotools Restriction Analyzer - free software tool for comprehensive restriction analysis of a DNA sequence. — URL: <https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php> (дата обращения: 05.11.2018).
93. Murata T., Ishikawa C. Chemical, physicochemical and spectrophotometric properties of crystalline chlorophyll-protein complexes from *Lepidium virginicum* L // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1981. – Т. 635. – №. 2. – С. 341-347.
94. Murata T., Murata N. Water-soluble chlorophyll proteins from *Brassica nigra* and *Lepidium virginicum* L // *Carnegie Inst. Wash. Year Book*. – 1971. – Т. 70. – С. 504-507.
95. Murata, T., Toda, F., Uchino, K., Yakushiji, E. Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. *botrys* (cauliflower) // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1971. – Т. 245. – №. 1. – С. 208-215.
96. Neverov K.V., Krasnovsky Jr A.A., Zabelin A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. Low-temperature (77 K) phosphorescence of triplet chlorophyll in isolated reaction centers of photosystem II // *Photosynthesis research*. – 2015. – Т. 125. – №. 1. – С. 43-49.
97. Nicholls D. G., Ferguson S. J. *Bioenergetics*. — Boston, MA: Academic Press, 2013. — С. 255.
98. Nishio N., Satoh H. A water-soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought-induced, 22-kilodalton protein in rapeseed // *Plant Physiology*. – 1997. – Т. 115. – №. 2. – С. 841-846.
99. Noguchi T., Kamimura Y., Inoue Y., Itoh S. Photoconversion of a water-soluble chlorophyll protein from *Chenopodium album*: resonance Raman and Fourier transform infrared study of protein and pigment structures // *Plant and cell physiology*. – 1999. – Т. 40. – №. 3. – С. 305-310.
100. Ohtsuki T., Ohshima S., Uchida A. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of water-soluble chlorophyll binding protein from *Chenopodium album* // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. – 2007. – Т. 63. – №. 9. – С. 740-741.
101. Oku T., Tomita G. The reversible photoconversion of *Chenopodium* chlorophyll protein and its control by the apoprotein structure // *Plant and cell physiology*. – 1975. – Т. 16. – №. 6. – С. 1009-1016.
102. Oku T., Yoshida M., Tomita G. Heat stability of the phototransforming activity of *Chenopodium* chlorophyll protein // *Plant and cell physiology*. – 1972A. – Т. 13. – №. 1. – С. 183-186.

103. Oku T., Yoshida M., Tomita G. The photoconversion of heat-treated *Chenopodium* chlorophyll protein and its pH dependence // Plant and cell physiology. – 1972B. – T. 13. – №. 5. – C. 773-782.
104. Olson J.M. The FMO protein // Discoveries in Photosynthesis. – Springer, Dordrecht, 2005. – C. 421-427.
105. Olson J.M., Romano C.A. A new chlorophyll from green bacteria. // Biochimica et biophysica acta. – 1962. – T. 59. – №. 3. – C. 726-728.
106. Ono M, Takahashi S., Shibata R., Tomizawa M., Nakayama K., Satoh H. Molecular Cloning and Functional Expression of A Class IIA WaterSoluble Chlorophyll-Binding Protein From *Brassica nigra* // Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences. – 2016. – T. 5. – №. 2. – C. 33-35.
107. Palm D. M., Agostini A., Aversch V., Girr P., Werwie M., Takahashi S., Satoh H., Jaenicke E., Paulsen H. Chlorophyll *a/b* binding-specificity in water-soluble chlorophyll protein // Nature Plants. – 2018. – T. 4. – №. 11. – C. 920-929.
108. Palm D.M., Agostini A., Pohland A.C., Werwie M., Jaenicke E., Paulsen H. Stability of Water-Soluble Chlorophyll Protein (WSCP) Depends on Phytol Conformation // ACS omega. – 2019. – T. 4. – №. 5. – C. 7971-7979.
109. Palm D.M., Agostini A., Tenzer S., Gloeckle B.M., Werwie M., Carbonera D., Paulsen H. Water-Soluble Chlorophyll Protein (WSCP) Stably Binds Two or Four Chlorophylls // Biochemistry. – 2017. – T. 56. – №. 12. – C. 1726-1736.
110. Prabahar V., Afriat-Jurnou L., Paluy I., Peleg Y., Noy D. New homologues of *Brassicaceae* water-soluble chlorophyll proteins shed light on chlorophyll binding, spectral tuning, and molecular evolution // The FEBS journal. – 2020. – T. 287. – №. 5. – C. 991-1004.
111. Prezelin B. B., Haxo F. T. Purification and characterization of peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the marine dinoflagellates *Glenodinium* sp. and *Gonyaulax polyedra* // Planta. – 1976. – T. 128. – №. 2. – C. 133-141.
112. Quach H.T., Steeper R.L., Griffin G.W. An improved method for the extraction and thin-layer chromatography of chlorophyll *a* and *b* from spinach // Journal of Chemical Education. – 2004. – T. 81. – №. 3. – C. 385.
113. Reinbothe C., Satoh H., Alcaraz J.-P., Reinbothe S. A Novel Role of Water-Soluble Chlorophyll Proteins in the Transitory Storage of Chlorophyllide // Plant Physiology. – 2004. – T. 134. – №. 4. – C. 1355-1365.
114. Renger G., Pieper J., Theiss C., Trostmann I., Paulsen H., Renger T., Eichler H.J., Schmitt F.-J. Water soluble chlorophyll binding protein of higher plants: A most suitable model system for basic analyses of pigment–pigment and pigment–protein interactions in chlorophyll protein complexes // Journal of plant physiology. – 2011. – T. 168. – №. 12. – C. 1462-1472.

115. Reviron M.P., Vartanian N., Sallantin M., Huet J.C., Pernollet J.C., de Vienne D. Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves // *Plant Physiology*. – 1992. – T. 100. – №. 3. – C. 1486-1493.
116. Riedl M., Renger T., Seibt J. Theory of 2D electronic spectroscopy of water soluble chlorophyll-binding protein (WSCP): Signatures of Chl *b* derivate // *The Journal of Chemical Physics*. – 2024. – T. 160. – №. 184114. – C. 1-21.
117. Ringys G. Molekulių kompleksų daugiafotoninių spektrų modeliavimas. Master's thesis [Vilniaus universitetas] – Vilnius, 2021 – C. 31.
118. Ritchie R. J. Measurement of chlorophylls *a* and *b* and bacteriochlorophyll *a* in organisms from hypereutrophic auxinic waters // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – T. 30. – №. 6. – C. 3075-3087.
119. Rusevich L., Embs J., Bektas I., Paulsen H., Renger G., Pieper J. Protein and solvent dynamics of the water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) // *EPJ Web of Conferences*. – EDP Sciences, 2015. – T. 83. – C. 02016.
120. Rustgi S., Boex-Fontvieille E., Reinbothe C., Wettstein D.V., Reinbothe S. Serpin1 and WSCP differentially regulate the activity of the cysteine protease RD21 during plant development in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – T. 114. – №. 9. – C. 2212-2217.
121. Saer R.G. Blankenship R. E. Light harvesting in phototrophic bacteria: structure and function // *Biochemical Journal*. – 2017. – T. 474. – №. 13. – C. 2107-2131.
122. Satoh H., Nakayama K., Okada M. Molecular Cloning and Functional Expression of a Water-soluble Chlorophyll Protein, a Putative Carrier of Chlorophyll Molecules in Cauliflower // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273. – №. 46. – C. 30568-30575.
123. Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M. Water-Soluble Chlorophyll Protein in *Brassicaceae* Plants is a Stress-Induced Chlorophyll-Binding Protein // *Plant and Cell Physiology*. – 2001. – T. 42. – №. 9. – C. 906-911.
124. Satoh H., Zanma A., Shinashi K. Molecular cloning and sequence analysis of a water-soluble chlorophyll protein cDNA from Japanese radish // *Journal of plant physiology*. – 2002. – T. 159. – №. 3. – C. 325-327.
125. Sawati L., Ferrari E., Stierhof Y. D., Kemmerling B., Mashwani Z. U. Molecular Effects of Biogenic Zinc Nanoparticles on the Growth and Development of *Brassica napus* L. Revealed by Proteomics and Transcriptomics // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – T. 13. – C. 798751-798751.
126. Schmidt K., Fufezan C., Krieger-Liszkay A., Satoh H., Paulsen H. Recombinant Water-Soluble Chlorophyll Protein from *Brassica oleracea* var. *Botrys* Binds Various Chlorophyll Derivatives // *Biochemistry*. – 2003. – T. 42. – №. 24. – C. 7427-7433.

127. Schmitt F.-J., Trostmann I., Theiss C., Pieper J., Renger T., Fuesers J., Hubrich E. H., Paulsen H., Eichler H. J., Renger G. Excited State Dynamics in Recombinant Water-Soluble Chlorophyll Proteins (WSCP) from Cauliflower Investigated by Transient Fluorescence Spectroscopy // The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – T. 112. – №. 44. – C. 13951-13961.
128. Schulte T., Johanning S., Hofmann E. Structure and function of native and refolded peridinin–chlorophyll–proteins from dinoflagellates // European journal of cell biology. – 2010. – T. 89. – №. 12. – C. 990-997.
129. Schulte T., Niedzwiedzki D. M., Birge R. R., Hiller R. G., Polívka T., Hofmann E., Frank H. A. Identification of a single peridinin sensing Chl-*a* excitation in reconstituted PCP by crystallography and spectroscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – T. 106. – №. 49. – C. 20764-20769.
130. Seibt J., Lindorfer D., Renger T. Signatures of intramolecular vibrational and vibronic Q_x–Q_y coupling effects in absorption and CD spectra of chlorophyll dimers // Photosynthesis Research. – 2023. – T. 156. – №. 1. – C. 19-37.
131. Shinashi K., Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M., Oonishi I. Molecular characterization of a water-soluble chlorophyll protein from main veins of Japanese radish // Journal of plant physiology. – 2000. – T. 157. – №. 3. – C. 255-262.
132. Song P.S., Koka P., Prezelin B.B., Haxo F.T. Molecular topology of the photosynthetic light-harvesting pigment complex, peridinin-chlorophyll *a*-protein, from marine dinoflagellates // Biochemistry. – 1976. – T. 15. – №. 20. – C. 4422-4427.
133. Srivastava A., Ahad S., Wat J.H., Reppert M. Accurate prediction of mutation-induced frequency shifts in chlorophyll proteins with a simple electrostatic model // The Journal of Chemical Physics. – 2021. – T. 155. – №. 15. – C. 151102.
134. Su X., Ma J., Wei X., Cao P., Zhu D., Chang W., Liu Z., Zhang X., Li M. Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex // Science. – 2017. – T. 357. – №. 6353. – C. 815-820.
135. Tabata K., Itoh S., Sugawa M., Nishimura M. Effect of sodium dodecyl sulfate on structure and spectroscopic characteristics of water-soluble chlorophyll protein complex isolated from stems of *Lepidium virginicum* // Plant and cell physiology. – 1983. – T. 24. – №. 6. – C. 987-994.
136. Takahashi S., Abe E., Nakayama K., Satoh H. Identification of genes encoding photoconvertible (Class I) water-soluble chlorophyll-binding proteins from *Chenopodium ficifolium* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2015. – T. 79. – №. 2. – C. 205-210.
137. Takahashi S., Aizawa K., Nakayama K., Satoh H. Water-soluble chlorophyll-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus* target the endoplasmic reticulum body // BMC Research Notes. – 2015. – T. 8. – №. 1. – C. 1-5.

138. Takahashi S., Ono M., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll-binding protein from Japanese wild radish // *Journal of Plant Physiology*. – 2013. – T. 170. – №. 4. – C. 406-412.

139. Takahashi S., Seki Y., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Are tyrosine residues involved in the photoconversion of the water-soluble chlorophyll-binding protein of *Chenopodium album*? // *Plant Biology*. – 2015. – T. 17. – №. 3. – C. 632-638.

140. Takahashi S., Seki Y., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Cysteine-2 and Cys30 are essential for chlorophyll-binding activity of the water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) of *Chenopodium album* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2014. – T. 78. – №. 11. – C. 1825-1832.

141. Takahashi S., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Effect of near-infrared irradiation on photoconversion of the water-soluble chlorophyll-binding protein of *Chenopodium album* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2015. – T. 79. – №. 3. – C. 439-442.

142. Takahashi S., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. The C-terminal Extension Peptide of Non-photoconvertible Water-Soluble Chlorophyll-Binding Proteins (Class II WSCPs) Affects Their Solubility and Stability: Comparative Analyses of the Biochemical and Chlorophyll-Binding Properties of Recombinant *Brassica*, *Raphanus* and *Lepidium* WSCPs with or Without Their C-terminal Extension Peptides // *The protein journal*. – 2014B. – T. 33. – №. 1. – C. 75-84.

143. Takahashi S., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Three-step photoconversion of only three subunits of the water-soluble chlorophyll-binding protein tetramer from *Chenopodium album* // *The Protein Journal*. – 2014A. – T. 33. – №. 4. – C. 337-343.

144. Takahashi S., Yanai H., Nakamaru Y., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Molecular Cloning, Characterization and Analysis of the Intracellular Localization of a Water-Soluble Chl-Binding Protein from Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) // *Plant and Cell Physiology*. – 2012. – T. 53. – №. 5. – C. 879-891

145. Takahashi S., Yanai H., Oka-Takayama Y., Zanma-Sohtome A., Fujiyama K., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) from Virginia pepperweed (*Lepidium virginicum*), a unique WSCP that preferentially binds chlorophyll *b in vitro* // *Planta*. – 2013. – T. 238. – №. 6. – C. 1065-1080.

146. Takahashi S., Yoshikawa M., Kamada A., Ohtsuki T., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. The photoconvertible water-soluble chlorophyll-binding protein of *Chenopodium album* is a member of DUF538, a superfamily that distributes in *Embryophyta* // *Journal of plant physiology*. – 2013. – T. 170. – №. 17. – C. 1549-1552.

147. Takamiya A. Distribution of photoconvertible, water-soluble chlorophyll protein complex CP668 in plants related to *Chenopodium album* // Carnegie Inst. Wash. Year Book. – 1973. – T. 72. – C. 330-336.
148. Takamiya A., Obata H., Yakushiji E. Properties of chlorophyll protein isolated from leaves of *Chenopodium album* // Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. – 1963. – C. 479-485.
149. The Angiosperm Phylogeny Group, Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // Botanical journal of the Linnean Society. – 2016. – T. 181. – №. 1. – C. 1-20.
150. Theiss C., Trostmann I., Andree S., Schmitt F. J., Renger T., Eichler H. J., Paulsen H., Renger G. Pigment-Pigment and Pigment-Protein Interactions in Recombinant Water-Soluble Chlorophyll Proteins (WSCP) from Cauliflower // The Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – T. 111. – №. 46. – C. 13325-13335.
151. Tronrud D.E., Wen J., Gay L., Blankenship R.E. The structural basis for the difference in absorbance spectra for the FMO antenna protein from various green sulfur bacteria. // Photosynthesis research. – 2009. – T. 100. – №. 2. – C. 79-87.
152. Tsang V.T., Kim H.H., Huang B., Chan S.C., Wong, T.T. *Lepidium virginicum* Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein with Chlorophyll *a* as a Novel Contrast Agent for Photoacoustic Imaging // Sensors. – 2025. – T. 25. – №. 11. – C. 3492.
153. Van Gelder B. F., Slater E. C. The extinction coefficient of cytochrome *c* // Biochimica et biophysica acta. – 1962. – T. 58. – №. 3. – C. 593-595.
154. Wen J., Zhang H., Gross M.L, Blankenship R.E. Native electrospray mass spectrometry reveals the nature and stoichiometry of pigments in the FMO photosynthetic antenna protein // Biochemistry. – 2011. – T. 50. – №. 17. – C. 3502-3511.
155. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation // Journal of Physical and Chemical Reference Data. – 1995. – T. 24. – №. 2. – C. 663-677.
156. Yakushiji E., Uchino K., Sugimura Y., Shiratori I., Takamiya F. Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium Album* // Biochimica et biophysica acta. – 1963. – T. 75. – C. 293-298.
157. Yamada K., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants // Plant and cell physiology. – 2011. – T. 52. – №. 12. – C. 2039-2049.
158. Zabelin A.A., Neverov K.V., Krasnovsky Jr A.A., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. Characterization of the low-temperature triplet state of chlorophyll in photosystem II core complexes: Application of phosphorescence measurements and Fourier transform infrared

spectroscopy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2016. – T. 1857. – №. 6. – C. 782-788.

159. Zatta S., Calcinoni¹ A., Agostini A., Leccese S., Onfroy T., Jolival C., Mezzetti A., Bortolus M., Carbonera D. Exploring the Triplet State of Chlorophyll *a* in Mesoporous Silica Matrices by Time-Resolved EPR // *Applied Magnetic Resonance*. – 2024. – C. 1-17.

160. Zhiltsova A.A., Krasnova E.D., Voronov D.A.E., Sokolovskaya Y.G., Patsaeva, S.V. Extinction coefficients of bacteriochlorophylls *d* and *e* in organic solvents for quantitative spectrophotometric determination of pigments of phototrophic green sulphur bacteria // *Optics and Spectroscopy*. – 2024. – T. 132. – №. 3. – C. 238-246.

161. Zhao H., Wang X., Wang L. Singlet Oxygen Generation and Signaling in Higher Plants // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2026. – T. 27. – №. 3. – C. 1462.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю огромную благодарность своему научному руководителю Михаилу Сергеевичу Крицкому за предложенную тему диссертации, за терпеливое наставничество, за постоянную помощь и всестороннее руководство моей работой.

Выражаю огромную благодарность Константину Викторовичу Неверову за систематическое консультирование и предоставленные советы при планировании фотохимических экспериментов, за помощь в получении чистого Хл *a* и создание осветительной установки для фотохимических экспериментов, за предоставление важных для работы реактивов, а также за помощь в технической организации фотохимических экспериментов.

Выражаю глубокую благодарность Юлии Владимировне Малеевой за систематическое консультирование в процессе микробиологической работы, моральную поддержку, предоставление для работы важных реактивов и помощь в организации работы на кафедре молекулярной биологии Биологического факультета МГУ.

Выражаю глубокую благодарность всему коллективу лаборатории экологической и эволюционной биохимии и, в частности, Юлии Ивановне Дерябиной, Юлии Леонардовне Вечтомовой и Таисии Александровне Телегиной за моральную поддержку и за всестороннюю помощь в проведении исследования, в т. ч. за помощь с реактивами и оборудованием.

Хочу поблагодарить ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ «Биотехнологии» РАН за возможность использования их инструментальной базы и выразить персональную благодарность Олегу Евгеньевичу Баранову и Владимиру Вениаминовичу Шубину за систематическую помощь в организации опытов и адаптации оборудования ЦКП под исследовательские потребности.

Хочу выразить благодарность членам коллектива ФИЦ ХФ РАН Дмитрию Александровичу Черепанову, Арсению Валерьевичу Айбушу, Георгию Евгеньевичу Милановскому и Виктору Андреевичу Надточенко за предоставленную возможность провести исследование холобелков WSCP на уникальном научном оборудовании.

Также хочу выразить благодарность всем сотрудникам ФИЦ «Биотехнологии» РАН, помогавшим мне в работе, делившимися ценными реактивами и оказывавшими моральную поддержку в ходе проведения исследования.